



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES INICIAIS DE CÁRIE
DENTÁRIA – ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Carolina Carvalho Salvado
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**REMINERALIZAÇÃO DE LESÕES INICIAIS DE CÁRIE
DENTÁRIA – ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por
Carolina Carvalho Salvado
Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso

e coorientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso
Prof. Doutora Patrícia Carvalho

setembro de 2016

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso, pela orientação, apoio constante, rigor, perfeccionismo e profissionalismo demonstrados que me permitiram a realização desta dissertação.

À Prof. Doutora Carla Ascenso e à Prof. Doutora Patrícia Carvalho, pela coorientação, disponibilidade e tempo despendido.

À Mestre Joana Carmo, pela disponibilidade, todo o apoio e constante boa disposição.

Ao Prof. Doutor Mário Polido, pela cedência dos materiais e do Laboratório de Biomateriais.

Ao ISCSEM e à Cooperativa Egas Moniz pela excelente formação que proporciona aos seus alunos.

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional e confiança depositada em mim. Por terem acompanhado de perto todo o meu percurso académico e por me terem tornado na pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, pelo orgulho que têm em mim, por me incentivarem e me fazerem acreditar. Apesar da distância, estiveram sempre presentes.

Ao João, pelo carinho, paciência infinita, compreensão e pelos sacrifícios.

A todos os colegas de curso pelos grandes momentos vividos e que permitiram fazer deste ciclo de formação uma das melhores fontes de enriquecimento, tanto profissional como pessoal.

RESUMO

Objetivos - Comparar o efeito da combinação de distintos produtos fluoretados, na remineralização de cáries induzidas artificialmente.

Materiais e métodos – 48 espécimes foram obtidos a partir de 12 molares humanos e aleatoriamente distribuídos em 4 grupos. 3 grupos (A, B e C) foram submetidos a uma solução tampão de ácido láctico a pH 5 durante 6 dias para indução de lesão de cárie. Todos os espécimes destes 3 grupos foram escovados duas vezes ao dia, com uma escova elétrica e uma pasta dentífrica fluoretada (1450ppm NaF), durante 7 dias, e submersos em saliva artificial durante os ciclos de escovagem. Ao grupo B (n=12) adicionou-se um verniz de flúor de alta concentração uma única vez. Ao grupo C (n=12) adicionou-se caseína fosfopeptídea com fosfato de cálcio amorfo durante 7 dias. O grupo D (n=12) não foi submetido à indução de lesão de cárie nem a qualquer tratamento. A superfície de cada espécime foi avaliada por microscopia eletrônica de varrimento e pelo teste de microdureza de Vickers. Na análise estatística usaram-se os testes ANOVA *one-way* (com um intervalo de confiança de 95%) e de Bonferroni.

Resultados – Todos os tratamentos produziram uma remineralização demonstrada pelos valores de dureza iguais ou superiores aos do grupo D. Os grupos A e B não demonstraram diferenças entre si ($p>0,05$). O grupo C foi o que apresentou uma maior dureza de superfície, diferindo dos outros grupos ($p<0,05$). A maior organização e homogeneidade topográfica foi verificada no grupo C, seguida dos grupos B e A, respectivamente.

Conclusões – Todos os tratamentos aumentaram a dureza de superfície, sugerindo a remineralização. A adição da caseína fosfopeptídea com fosfato de cálcio amorfo à pasta dentífrica fluoretada foi a que demonstrou uma maior dureza de superfície. A adição do verniz de flúor de alta concentração não demonstrou diferença significativa quando comparado à aplicação única de pasta dentífrica fluoretada.

Palavras-chave: Flúor, fosfato de cálcio, remineralização, *white spot*

ABSTRACT

Objectives – To compare the combination effect of different fluoride-containing products in remineralization of caries-like lesions.

Materials and methods – 48 specimens were obtained from 12 human molars and randomly divided into 4 different groups. 3 groups (A, B and C) were subjected to a lactic acid buffer solution at pH 5 for artificial induction of white spot lesions. All specimens of these 3 groups were brushed twice a day, with an electric toothbrush and a fluoridated toothpaste (1450ppm NaF), for 7 days, and submerged in artificial saliva during brushing cycles. A high-concentration fluoride varnish was added in the group B (n=12) once a week. Casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate was added in the group C (n=12) once a day. The group D (n = 12) was not submitted to the induction of caries or any treatment. The surface of each specimen was evaluated by scanning electron microscopy and by the Vickers microhardness test. Relating to statistic analysis, ANOVA one-way (with a 95% confidence interval) and Bonferroni were the tests used.

Results – All treatments produced a remineralization demonstrated by equal or higher hardness values than those of the group D. The groups A and B showed no differences ($p>0,05$). Group C showed the greater surface hardness differing from the other groups ($p<0,05$). The greater organization and topographical homogeneity was verified in group C, followed by group B and A, respectively.

Conclusions – All treatments increased the surface hardness, suggesting remineralization. The addition of casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate to fluoride toothpaste showed a greater increase of surface hardness. The addition of high concentration fluoride varnish showed no significant difference when compared to the single application of fluoridated toothpaste.

Keywords: Fluoride, calcium phosphate, remineralization, white spot

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE GERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	9
I. INTRODUÇÃO.....	11
I.1 ESMALTE HUMANO.....	13
I.1.1 Constituição e Propriedades Químicas	13
I.1.2 Microestrutura	13
I.1.3 Macroestrutura.....	14
I.1.4 Propriedades Mecânicas	15
I.1.5 Papel da Saliva na Proteção do Esmalte.....	16
I.2 CÁRIE DENTÁRIA.....	19
I.2.1 Definição	19
I.2.2 Aspetos Bioquímicos.....	20
I.2.3 Aspetos Histológicos	21
I.2.4 Classificação	22
I.2.5 Potencial cariogénico.....	23
I.2.6 Prevalência.....	23
I.2.7 Incidência.....	24
I.2.8 Manifestações Clínicas	25
I.2.9 Distribuição	26
I.2.10 Diagnóstico e Índices de Classificação	26
I.2.11 Indução Artificial de Lesões de Cárie.....	28
I.2.12 Prevenção e Remineralização das Lesões Cariogénicas.....	29
I.3 PERTINÊNCIA DO ESTUDO	35
I.4 OBJETIVOS.....	36
I.5 HIPÓTESE NULA	37

II. MATERIAIS E MÉTODOS	39
II.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
II.2 LOCAL DO ESTUDO	39
II.3 DESENHO DO ESTUDO.....	39
II.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA	39
II.5 PREPARAÇÃO E SECÇÃO DOS DENTES.....	41
II.6 POLIMENTO DAS AMOSTRAS.....	43
II.7 INDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO SIMULANDO LESÕES ARTIFICIAIS DE <i>WHITE SPOT</i>	44
II.8 ALEATORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E APLICAÇÃO DOS AGENTES INDUTORES DE REMINERALIZAÇÃO	45
II.9 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE	48
II.9.1 Teste de Microdureza de Vickers	48
II.9.2 Observação ao Microscópio Eletrónico de Varrimento	49
III. RESULTADOS	51
III.1 TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS.....	51
III.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO..	54
IV. DISCUSSÃO.....	63
IV.1 TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS	63
IV.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO ...	66
IV.3 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	68
IV.4 PERSPETIVAS FUTURAS	69
V. CONCLUSÃO.....	71
VI. BIBLIOGRAFIA.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Conceito do equilíbrio da cárie. Figura retirada de Featherstone (2008) com permissão do Prof. Dr. John Featherstone.	20
Figura 2 - Fluxograma do procedimento experimental.	40
Figura 3 - Máquina de corte de precisão Accutom-50 (Struers).	41
Figura 4 - Secção de um dente no sentido mesio-distal.	41
Figura 5 - Obtenção de dois fragmentos através da secção no sentido mesio-distal....	41
Figura 6 - Secção de um dente no sentido vestibulo-lingual.	42
Figura 7 - Resultado da secção no sentido vestibulo-lingual.	42
Figura 8 - Secção da raiz de um dente, perpendicularmente ao LED.	42
Figura 9 - Obtenção, a partir de um molar, de quatro espécimes com uma área de 3x4mm.....	42
Figura 10 - Máquina LaboPol-4 [®] (Struers) e disco de polimento.	43
Figura 11 - Espécime antes de ser submetido ao polimento: (à esquerda) vista superior e (à direita) vista lateral.	43
Figura 12 - Espécime submetido a polimento.	44
Figura 13 - Espécime após ser submetido ao polimento: (à esquerda) vista superior e (à direita) vista lateral.	44
Figura 14 - Escova elétrica (<i>Oral-B</i> , <i>Vitality</i> , <i>Braun</i>) e pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm de NaF) utilizadas na escovagem dos espécimes.	46
Figura 15 - Verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (<i>ClinproTM White Varnish</i> , 3M ESPE).	47
Figura 16 - Pasta de CPP-ACP (<i>GC Tooth Mousse</i> , <i>RecaldentTM</i>).	47
Figura 17 - Máquina HSV-30 [®] (Shimadzu) usada nos testes de microdureza de Vickers.....	48
Figura 18 - Exemplo de indentação num espécime.	49
Figura 19 - Exemplo de medição de dureza de um espécime.	49
Figura 20 - Microscópio Eletrónico de Varrimento (JEOL JSM-700001F) utilizado neste trabalho para a análise da superfície dos espécimes.	50
Figura 21 - Metalização dos espécimes no Quorum Technologies modelo Q150T ES.	50
Figura 22 - Gráfico comparativo das médias de microdureza do esmalte dos diferentes grupos.....	52

Figura 23 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada.	55
Figura 24 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. A generalidade da superfície apresenta um aspeto lacunar e heterogéneo, com dispersão na orientação dos cristais.	56
Figura 25 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. É evidente um aumento da desorganização da superfície, sendo notória a presença de várias lacunas entre os cristais. De notar a diferente orientação dos cristais de esmalte.....	56
Figura 26 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. Presença de diferentes camadas de verniz de flúor, polimerizado/endurecido sobre a superfície do esmalte.	57
Figura 27 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. É evidente a remineralização generalizada da superfície.....	57
Figura 28 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. Evidente oclusão interprismática.	58
Figura 29 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observa-se uma fratura de tensão por desidratação (seta).	58
Figura 30 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. É evidente uma superfície mais homogénea sugestiva de deposição mineral pela precipitação de fosfato de cálcio com notório preenchimento das falhas e espaços lacunares originados pelo ácido láctico.	59

Figura 31 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de <i>white spot</i> e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observam-se distintas zonas aglomeradas entre si compatíveis com a deposição mineral do CPP-ACP e preservação de substância interprismática.....	59
Figura 32 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x2500, sem indução de lesões artificiais de <i>white spot</i> ou qualquer tratamento.	60
Figura 33 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, sem indução de lesões artificiais de <i>white spot</i> ou qualquer tratamento. É evidente a microrugosidade natural do esmalte.	60
Figura 34 - Fotomicrografia sobre a superfície de esmalte a x20000, sem indução de lesões artificiais de <i>white spot</i> ou qualquer tratamento.	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios associados à integridade ou à presença de restaurações no dente, baseados no ICDAS (<i>International Caries Detection and Assessment System</i>).	28
Tabela 2 - Critérios associados à presença ou não de cárie e ao seu estado, baseados no ICDAS (<i>International Caries Detection and Assessment System</i>).	28
Tabela 3 - Medidas descritivas dos diferentes grupos.	51
Tabela 4 - Resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk.....	52
Tabela 5 - Teste de homogeneidade de variâncias de Levene (df1 = número de grupos -1; df2 = número de espécimenes - número de grupos).	53
Tabela 6 - Teste paramétrico ANOVA a um fator (<i>one-way ANOVA</i>).	53
Tabela 7 - Resultados da comparação múltipla das médias dos grupos estudados pelo teste de Bonferroni (teste <i>post-hoc</i>).....	54
Tabela 8 - Resumo das imagens obtidas na microscopia eletrônica de varrimento dos diferentes grupos.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FA – Fluorapatite

Fig. – Figura

fTCP – *Functionalised β -Tricalcium Phosphate*

CPP-ACP – *Casein Phosphopeptide – Amorphous Calcium Phosphate*

CPP-ACFP – *Casein Phosphopeptide – Amorphous Calcium Fluoride Phosphate*

°C – graus Celsius

HA– Hidroxiapatite

HV – *Hardness Vickers*

LED – Longo eixo do dente

μm – micrómetro

MEV – Microscópio Eletrónico de Varrimento

mL – mililitro

mm – milímetro

nm – nanómetro

N – Newton

OMS – Organização Mundial de Saúde

TCP – *Tricalcium Phosphate*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

rpm – rotações por minuto

WSL – *White Spot Lesion*

I. INTRODUÇÃO

As patologias orais afetam cerca de 3,9 mil milhões de pessoas, sendo as cáries dentárias não tratadas na dentição permanente a doença crónica oral mais dominante, com uma prevalência global de 35% (Marcenes et al., 2013). A cárie é considerada pela OMS como um grave problema de Saúde Pública (Melo, Azevedo, & Henriques, 2008). É definida como uma progressiva desmineralização do esmalte, que ocorre quando bactérias cariogénicas metabolizam açúcares provenientes da dieta em ácidos, promovendo a dissolução e libertação de iões de cálcio e fosfato dos cristais de hidroxiapatite (HA) (Buzalaf, Pessan, Honório, & Cate, 2011). As lesões de cárie progridem gradualmente, iniciando-se como uma mínima alteração estrutural macroscopicamente não detetável, progredindo para uma condição clinicamente visível até uma total destruição dos tecidos duros do dente (Cochrane, Cai, Huq, Burrow, & Reynolds, 2010). No entanto, a fase inicial da lesão de cárie é reversível e para que ocorra a sua remineralização devem estar biodisponíveis iões de cálcio, fosfato e flúor em níveis suficientes na cavidade oral (Chen & Wang, 2011; Llana, Leyda & Forner, 2015).

Apesar da saliva apresentar um importante papel na remineralização de lesões de cárie, ao disponibilizar iões de flúor, cálcio e fosfato ao dente (Li, Wang, Joiner, & Chang, 2014), o facto de algumas proteínas salivares como a estaterina e fosfoproteínas ricas em prolina se ligarem aos iões de cálcio e fosfato, torna mais lento o processo de remineralização (Cochrane et al., 2010). O processo de remineralização consiste essencialmente na saturação do meio envolvente do dente por iões de flúor, cálcio e fosfato são fornecidos ao dente de modo a promover a sua deposição nos cristais desmineralizados (Featherstone, 2008; Elkassas & Arafa, 2013).

Numa perspectiva minimamente invasiva, a medicina dentária, tem-se suportado por procedimentos e técnicas que possam controlar a progressão da cárie dentária (Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014) e diversas estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de estagnar, ou mesmo reverter, lesões iniciais de cárie designadas lesões de *white spot* (WSL) (Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014).

Sabe-se que o flúor é considerado o pilar da remineralização e tem sido efetivo na proteção do esmalte ao inibir a sua desmineralização e favorecer a sua remineralização (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012; Carmona-Arango, Lujan-Pardo, & Martinez, 2013; Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014). A aplicação tópica de produtos fluoretados tem como objetivo aumentar o tempo de contacto do flúor com o esmalte (Duraismy, Xavier,

Nayak, Reddy, & Rao, 2015) ao promover a formação de um reservatório de fluoreto de cálcio (CaF_2), do qual o flúor é libertado assim que há uma diminuição do pH, formando-se cristais de fluorapatite (FA), juntamente com iões de cálcio e fosfato que são libertados aquando da desmineralização (Llena et al., 2015).

No entanto, uma vez que a remineralização do esmalte com produtos fluoretados é limitada pela biodisponibilidade dos iões de cálcio e fosfato presentes na saliva, e estes podem não ser suficientes (Reynolds, 2008; Shen et al., 2015), foram desenvolvidos novos agentes para melhorar a sua capacidade remineralizadora (Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014).

Recentemente, uma gama de sistemas de libertação de iões fosfato e cálcio foi introduzida no mercado com o objetivo de promover novos caminhos para a remineralização de lesões não cavitadas (Elkassas & Arafa, 2013; Farooq, Moheet, Imran & Farooq, 2013). Estes sistemas podem ser categorizados em formulações cristalinas, amorfas não estabilizadas e amorfas estabilizadas. O fosfato de cálcio (TCP – *tricalcium phosphate*) insere-se nos sistemas cristalinos. O ACP (*amorphous calcium phosphate*) é um sistema amorfo não estabilizado que consegue promover a remineralização e inibir a desmineralização aquando de um ataque ácido. Por fim, o CPP (*casein phosphopeptide*) pertence ao sistema amorfo estabilizado e tem uma capacidade de estabilizar o ACP, formando nanocomplexos de CPP-ACP (*casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate*) que favorecem a supersaturação de iões de fosfato e de cálcio potenciando a remineralização (Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014; Duraisamy et al., 2015;).

Uma vez que, para a máxima eficácia da remineralização, é necessária a coexistência de iões de fosfato, cálcio e flúor em quantidades significativas, a combinação destes novos sistemas com o flúor podem induzir um efeito sinérgico na formação de cristais de FA e, portanto, na atenuação da progressão de lesões de cárie (Shen et al., 2015).

Assim, torna-se útil estudos que visem comparar a aplicação de apenas um produto fluoretado com a sua combinação com outros produtos que disponibilizem iões de cálcio e fosfato, sobre lesões iniciais de cárie.

I.1 ESMALTE HUMANO

I.1.1 Constituição e Propriedades Químicas

O esmalte é um tecido dentário acelular constituído por matéria inorgânica (96% do seu peso), água (3% do seu peso) e matéria orgânica (1% do seu peso) (Lussi, Schlueter, Rakhmatullina, & Ganss, 2011; Li et al., 2014). A matéria inorgânica é composta maioritariamente por cálcio e fosfato, apresentando também outros minerais como sódio, magnésio, potássio e zinco (García-Godoy & Hicks, 2008; Lussi et al., 2011). A matéria orgânica, por sua vez, é constituída por proteínas e lípidos (Li et al., 2014; West & Joiner, 2014).

A fase mineral do esmalte apresenta-se na forma de cristais de hidroxiapatite (HA) que apresentam a fórmula estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Robinson et al., 2000; Laurance-Young et al., 2011; Lussi et al., 2011; Zheng, Zheng, Zhang, Qian, Zhou, 2013). O cristal pode sofrer alterações na sua composição por perda ou substituição de iões. Quando são incluídos iões não pertencentes ao seu arranjo original, leva a uma forma impura dos minerais de hidroxiapatite designados por hidroxiapatite carbonatada com défice de cálcio que é mais suscetível aos ataques ácidos (Lussi et al., 2011; West & Joiner, 2014; Duraisamy et al., 2015;). O lugar do cálcio pode ser ocupado pelo sódio, magnésio, zinco ou potássio; o fluoreto pode substituir o hidroxilo e o fosfato pode ser substituído pelo carbonato. Estas alterações influenciam o comportamento da HA e as suas propriedades físicas e químicas, nomeadamente a sua solubilidade na presença de valores de pH reduzidos (Robinson et al., 2000; Lussi et al., 2011; West & Joiner, 2014)

A substituição de hidroxilo por fluoreto aumenta a resistência dos cristais à desmineralização (West & Joiner, 2014). Já na presença do ião carbonato, o cristal de HA apresenta uma maior solubilidade (Featherstone, 2008; Lussi et al., 2011). Ao contrário do ião fluoreto que é incluído à superfície do esmalte, a inclusão do ião carbonato ocorre maioritariamente nos cristais internos. Desta forma, a solubilidade do esmalte varia com a profundidade, aumentando da superfície para o interior do tecido (Laurance-Young et al., 2011; Lussi et al., 2011; West & Joiner, 2014).

I.1.2 Microestrutura

Estruturalmente, o esmalte é composto por prismas cilíndricos sendo estes a unidade básica estrutural do esmalte (West & Joiner, 2014). Por sua vez, os prismas são constituídos por, aproximadamente, 1000 cristais de HA organizados entre si (Robinson

et al., 2000). Cada cristal de HA apresenta cerca de 50-70nm de largura, 20-25nm de espessura e 100µm de comprimento podendo atravessar a totalidade da espessura do esmalte (Lussi et al., 2011). Os cristais orientam-se de forma a que o seu longo eixo e o longo eixo dos prismas se encontrem paralelos. No entanto, na periferia de cada prisma, os cristais desviam-se formando um ângulo de 45° em relação ao eixo axial (Zhang, Du, Zhou, & Yu, 2014), que dá origem ao espaço intercrystalino, que é preenchido por água e compostos orgânicos, e constitui um meio de difusão para pequenas moléculas como o ácido láctico, peróxido de hidrogénio e outros iões (Robinson et al., 2000; West & Joiner, 2014). É neste espaço que os processos de desmineralização e remineralização ocorrem (Buzalaf et al., 2011).

Existem vários métodos que permitem observar a microestrutura do esmalte como a microscopia eletrónica de varrimento (MEV), microscopia de transmissão de eletrões e a luz estereomicroscópica (Schlueter, Hara, Shellis, & Ganss, 2011; Lippert & Lynch, 2014).

A MEV é um instrumento complementar que permite elucidar as alterações ultra-morfológicas superficiais induzidas por diferentes agentes remineralizantes (Elkassas & Arafa, 2013). É uma forma de análise que promove imagens de alta resolução e tridimensionais e informação topográfica (Chen, Parolia, Pau, & Celerino De Moraes Porto, 2015). Utiliza um feixe de eletrões em vácuo com uma determinada energia para bombardear a superfície do material a analisar que deve estar revestida com um metal (Schlueter et al., 2011).

Quando observado através da MEV, o esmalte dentário hígido apresenta uma aparência lisa e homogénea devido à união firme dos cristais de HA. Quando ocorre o processo de desmineralização, observa-se uma amplificação dos espaços intercrystalinos do esmalte, os quais contribuem para o aumento da porosidade da região (Elkassas & Arafa, 2013; Fejerskov, Nyvad, & Kidd, 2015).

I.1.3 Macroestrutura

Uma vez que a distribuição dos componentes que constituem o esmalte não é uniforme, a sua morfologia não se apresenta da mesma forma em todos os locais da coroa (West & Joiner, 2014). Anatomicamente, a espessura do esmalte não é homogénea, apresentando uma maior profundidade nas faces oclusais, ao nível das cúspides, e nos bordos incisais chegando a apresentar até 2,5mm de espessura, apresentando 1,3mm nas

faces laterais e uma menor profundidade ao nível cervical (Berkovitz, Holland & Moxham, 2009; West & Joiner, 2014).

A espessura do esmalte não varia só de indivíduo para indivíduo como de dente para dente no mesmo indivíduo, aumentando do primeiro para o terceiro molar (Berkovitz et al., 2009).

I.1.4 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas do dente incluem a dureza, a viscoelasticidade, a resistência à fratura e a elasticidade. O estudo destas propriedades contribuem para o conhecimento tanto do dente em si como de materiais dentários (Zhang et al., 2014).

A estrutura e a composição do esmalte determinam as suas propriedades mecânicas (Zhang et al., 2014). O conteúdo mineral e a densidade dos cristais e dos prismas não são uniformes em toda a extensão do esmalte, sendo maior em zonas mais espessas de esmalte e mais reduzido ao nível cervical, levando a alterações do comportamento mecânico deste tecido (West & Joiner, 2014). A densidade apresenta valores compreendidos entre 2.89 a 3.12 g/cm³ (Lussi et al., 2011). Propriedades mecânicas tais como a densidade, o módulo de elasticidade e a dureza do esmalte tendem a diminuir com a distância à superfície do esmalte (Lussi et al., 2011).

Dureza

O esmalte é o tecido mais duro e mineralizado do corpo humano (Li et al., 2014; West & Joiner, 2014). A dureza é a medida que representa a capacidade de um material resistir a uma deformação e fratura numa determinada área (Zhang et al., 2014).

A dureza do esmalte depende da técnica de medida utilizada (Lussi et al., 2011), sendo que as formas mais frequentes da sua medição são os testes de Vickers e Knoop diferindo no ângulo do indentador e na força aplicada (Zhang et al., 2014).

Teste de Microdureza de Vickers

O teste da microdureza de Vickers é considerado um método razoavelmente confiável, fácil, rápido e apenas necessita de uma reduzida área de superfície do espécime para obter a medida da sua dureza (Elkassas & Arafa, 2013; Strnad & Buka, 2014). É comumente utilizado para o estudo das propriedades físicas do dente e para a obtenção de informações indiretas sobre as alterações do conteúdo mineral dos tecidos duros

dentários em estudos *in vitro* (Elkassas & Arafa, 2013; Memarpour, Soltanimehr, & Sattarahmady, 2015).

A dureza de superfície de Vickers é medida através da resistência de um substrato à deformação por um indentador piramidal de base quadrada formando, entre as duas faces, um ângulo de 136° (Zhang et al., 2014). A dureza é calculada pelo comprimento da indentação e a carga aplicada durante um período de tempo específico (Zhang et al., 2014). Para obter medidas precisas, este teste implica que a superfície do espécime seja polida para que esta se posicione perpendicularmente ao longo eixo do indentador (Schlueter et al., 2011; Elkassas & Arafa, 2013). O polimento também proporciona a padronização dos espécimes, ao remover variações naturais da superfície de esmalte, entre o próprio dente e entre diferentes dentes, que podem levar a alterações da sua resposta à desmineralização (Elkassas & Arafa, 2013).

1.1.5 Papel da Saliva na Proteção do Esmalte

Características e Funções da Saliva

A saliva é um fluido biológico secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade oral (Fejerskov et al., 2015; Zhang, Zheng, Zheng, & Zhou, 2015). A maioria da saliva é secretada pelas glândulas salivares *major*, como a parótida, a submandibular e a sublingual e a única diferença entre elas consiste na viscosidade pela diferente constituição de proteínas salivares (Fejerskov et al., 2015). É constituída por componentes orgânicos como proteínas, glicoproteínas, glucose e ureia, e por componentes inorgânicos nomeadamente o cálcio, fosfato e flúor (Dawes, 2008; García-Godoy & Hicks, 2008; Ionta et al., 2014). Os componentes orgânicos formam uma película protetora, designada película adquirida, na superfície de esmalte, que funciona com uma barreira protetora e uma membrana com permeabilidade seletiva prevenindo o contacto direto entre os ácidos e a superfície dentária. Os componentes inorgânicos servem como reservatório para a nucleação de novos nanocristais (Wang, Mihailova, Klocke, Heidrich, & Bismayer, 2011).

Apresenta inúmeras funções desde a proteção e lubrificação, neutralização dos ácidos (capacidade tampão), proteção antibacteriana (Featherstone, 2008) e manutenção da integridade do esmalte (García-Godoy & Hicks, 2008; Ionta et al., 2014).

A capacidade tampão da saliva é essencial para diminuir o tempo necessário ao restabelecimento dos níveis de pH fisiológicos. Acima de um pH de 5,5, a sua capacidade

tampão é determinada principalmente pelos sistemas tampão fosfato e bicarbonato, uma vez que estes neutralizam os ácidos libertados pelas bactérias cariogénicas, prevenindo a desmineralização e impedindo que se reúnam as condições ótimas para a colonização de outros microorganismos patogénicos (Dawes, 2008; Fejerskov et al., 2015).

Grau de Saturação

Em condições fisiológicas, as estruturas mineralizadas que constituem o dente realizam constantemente trocas iónicas com a saliva numa relação de equilíbrio (Li et al., 2014). Deste modo, a saliva é um dos principais mecanismos que interfere no ganho e perda mineral na interface esmalte-placa bacteriana por, em níveis de pH fisiológicos, manter em supersaturação os níveis de cálcio e fosfato em relação aos cristais de HA (García-Godoy & Hicks, 2008; Neto, Maeda, Turssi, & Serra, 2009; Ionta et al., 2014).

Os iões de cálcio e fosfato provenientes da saliva e da estrutura cristalina do dente quando sofre desmineralização, são transportados de forma passiva da saliva e do biofilme para a subsuperfície de esmalte desmineralizado (García-Godoy & Hicks, 2008; Li et al., 2014).

Quando ocorre uma diminuição do pH abaixo de 5,5 em consequência de um ataque ácido, ocorre uma subsaturação da saliva, levando a um aumento da solubilidade da apatite e, consequentemente, à dissolução dos cristais de HA (West & Joiner, 2014).

Assim, a saliva consegue proteger o esmalte dentário até um pH de 5,5 – pH crítico que corresponde ao valor a partir do qual a saturação da saliva em relação à HA perde a sua capacidade de proteção e conduz à perda mineral do esmalte pela libertação de iões cálcio, fosfato e hidroxilo na cavidade oral (West & Joiner, 2014).

Película Adquirida

Quando o esmalte está exposto à saliva, um filme proteico é formado sobre a sua superfície (Fejerskov et al., 2015). Este filme é denominado película adquirida sendo constituída por proteínas, péptidos e lípidos (Hannig & Hannig, 2014) e apresenta, normalmente, uma espessura de 1µm (Fejerskov et al., 2015).

Uma vez que a camada exterior dos cristais de hidroxiapatite apresentam uma carga iónica positiva, devido essencialmente ao cálcio, todas as proteínas com uma carga negativa são atraídas para a superfície do esmalte e ligam-se através de interações iónicas, forças *van der Waals* e interações hidrofóbicas (Hannig & Hannig, 2014; Fejerskov et al., 2015). As proteínas ricas em prolina, a histatina e a estaterina são as primeiras proteínas

que formam a película adquirida pela sua carga negativa e são o elo de ligação entre o esmalte e outras proteínas através de complexas interações entre elas (Hannig & Hannig, 2014; Fejerskov et al., 2015). A importância desta película deve-se ao facto de promover a adesão ou a repulsão de certos microorganismos controlando, assim, a colonização bacteriana. A película ajuda também na remineralização do esmalte, uma vez que mantém iões de cálcio e fosfato em proximidade com a superfície dentária (Fejerskov et al., 2015).

A ação mecânica da escovagem dos dentes não promove a remoção ou a diminuição da espessura da película adquirida, no entanto, algumas pastas dentífricas que contêm lauril sulfato de sódio podem diminuir a capacidade de adsorção de novas proteínas, o que pode levar a um aumento da vulnerabilidade do esmalte (Fejerskov et al., 2015).

Quantidade da saliva

Diariamente é produzido 0.5 a 1 litro de saliva, sendo que são produzidos 0,2 a 0,5 mL por minuto de saliva não estimulada e 1,0 a 2,0 mL por minuto de saliva estimulada. A condição que torna estes valores reduzidos designa-se hipossalialia e pode-se dever a patologias da glândula, como distúrbios endócrinos e autoimunes, à toma de certos medicamentos, como antidepressivos, anti-histamínicos e anti-hipertensores, ou a tratamento de doenças como a radioterapia (Fejerskov et al., 2015). Uma vez que, em casos de hipossalialia, a biodisponibilidade de iões de cálcio e fosfato é limitada e a *clearance* de açúcares e ácidos é reduzida, desenvolve-se um aumento do risco de lesões causadas pela desmineralização das estruturas dentárias (Featherstone, 2008; Fejerskov et al., 2015)

Limitações da Saliva

Apesar de possuir uma capacidade remineralizadora, esta não é tão rápida quando comparada com a aplicação de agentes remineralizadores externos, uma vez que a presença de proteínas salivares como a estaterina e proteínas ricas em prolina podem inibir a precipitação total de fosfato de cálcio para a formação de cristal, ao ligar-se aos iões de cálcio e fosfato (Cochrane et al., 2010).

Saliva artificial

Estudos *in vitro* são essenciais para o estudo da desmineralização e remineralização uma vez que podem ser feitos num curto período de tempo, requerem menos custos e não dependem da colaboração de participantes. No entanto, não são capazes de reproduzir características biológicas da cavidade oral, tal como a saliva (Mohammed, Lynch, &

Anderson, 2014). As dificuldades e limitações do uso de saliva natural, pelo tempo de recolha e pela sua rápida decomposição (Aykut-Yetkiner, Wiegand, & Attin, 2014), implicam o uso de formulações de saliva artificial que, pelas alterações da sua composição e pela inexistência da formação da película adquirida, apresentam menor capacidade protetora (Wang et al., 2011; Ionta et al., 2014; Mohammed et al., 2014).

Foi demonstrado que a saliva artificial é um agente efetivo no aumento da dureza de esmalte desmineralizado em estudos *in vitro* (Aykut-Yetkiner et al., 2014), existindo diversas formulações de saliva artificial na literatura que mimetizam a capacidade remineralizadora necessária à realização deste tipo de estudos (Ionta et al., 2014).

I.2 CÁRIE DENTÁRIA

I.2.1 Definição

A cárie é uma doença complexa que se caracteriza como sendo crónica, infecciosa e transmissível (Keyes, 1960). Trata-se de um processo contínuo que evolui desde alterações subclínicas a nível da subsuperfície do esmalte até à completa destruição do dente e pode ser interrompido a qualquer momento (Sala & García, 2013).

Apresenta um carácter multifatorial (Melo et al., 2008; Sala & García, 2013), resultando da interação, ao longo do tempo, entre a presença de bactérias produtoras de ácidos localizadas no biofilme da superfície dos dentes, o substrato que estas metabolizam, e fatores do hospedeiro como o dente e a saliva (Melo et al., 2008; Sala & García, 2013). Os fatores do hospedeiro baseiam-se na sua suscetibilidade de desenvolver a lesão de cárie e subdividem-se em fatores intrínsecos como o fluxo, a composição e capacidade tampão da saliva, componentes imunológicos e fatores genéticos; e fatores extrínsecos relacionados com a estrutura sociocultural em que o indivíduo está inserido dependendo do estilo de vida, estrato social e educação (Fig. 1) (Lima, 2007; Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007).

Fatores comportamentais podem estar, também, implicados na progressão da cárie, como o tipo de higiene oral, os hábitos alimentares e o uso de medicamentos que contenham açúcar. Desta forma, o risco de cárie varia de pessoa para pessoa (Selwitz et al., 2007).

1.2.2 Aspetos Bioquímicos

A remineralização e desmineralização são processos que coexistem no dente (Niu et al., 2014) e ocorrem durante a flutuação do pH da cavidade oral como consequência do metabolismo bacteriano de hidratos de carbono fermentáveis (Carmona-Arango et al., 2013; Llena et al., 2015) e do contacto com ácidos de origem não bacteriana (Li et al., 2014), envolvendo o fluxo de cálcio e fosfato para o interior e exterior do dente (Xiang et al., 2012), respetivamente. Dão-se de forma cíclica e contínua na cavidade oral desde que seja assegurado um equilíbrio entre os fatores protetores e os fatores patológicos das lesões de cárie (Featherstone, 2008).

Consideram-se fatores protetores: o fluxo salivar e os seus componentes, a presença de flúor, de agentes remineralizantes e de outros agentes antibacterianos como a clorohexidina. No que diz respeito aos fatores patológicos, encontram-se entre estes: as bactérias cariogénicas, hidratos de carbono fermentáveis e disfunções salivares (Fig. 1) (Featherstone, 2008; Oliveira et al., 2014).

A desmineralização pode ter etiologia bacteriana ou não bacteriana: cárie ou erosão, respetivamente. A cárie deriva de sucessivos ataques ácidos de origem bacteriana, implicando também outros fatores como a dieta e a suscetibilidade do indivíduo. A erosão, por sua vez, envolve a dissolução de esmalte por ácidos de origem não bacteriana ou condições patológicas como refluxo gastroesofágico ou bulimia

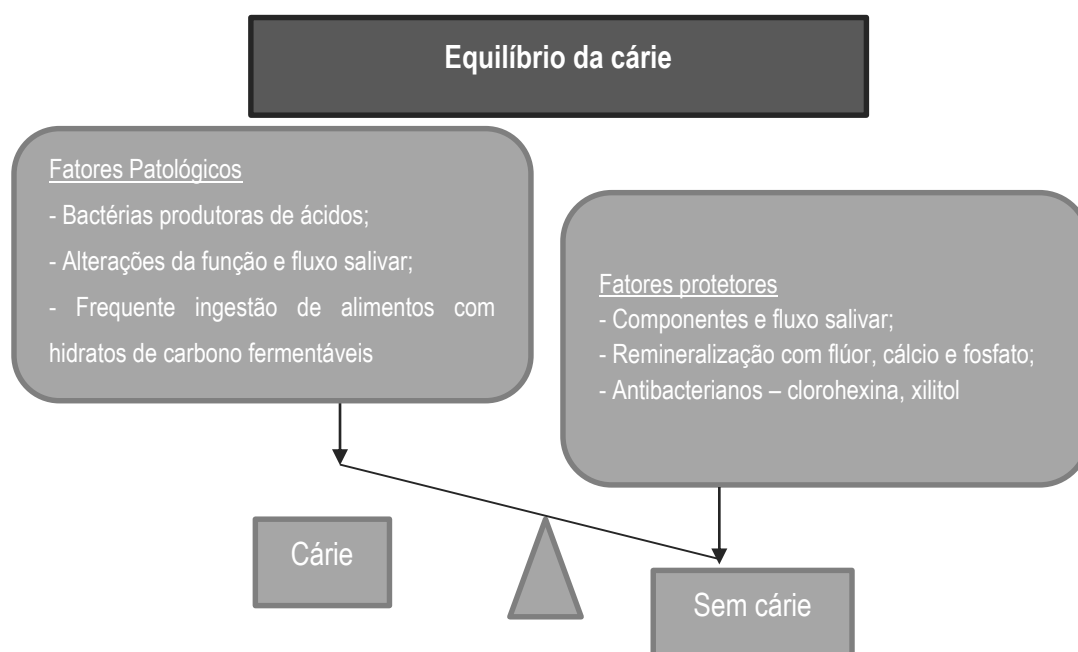


Figura 1 - Conceito de equilíbrio da cárie. Figura retirada de Featherstone (2008) com permissão do Prof. Dr. John Featherstone.

nervosa (Lussi et al., 2011). Ambas as causas de desmineralização podem provocar a perda de tecido dentário irreversível caso não sejam aplicadas estratégias preventivas ou revertíveis atempadamente (West & Joiner, 2014).

A lesão de cárie é o resultado de uma acumulação de eventos múltiplos de remineralização e desmineralização desencadeados ao longo do tempo (Melo et al., 2008). Estes sucessivos eventos resultam numa contínua diminuição do pH na interface esmalte-biofilme, para valores inferiores a 5,5, devido à produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético e ácido propiónico por bactérias cariogénicas (Melo et al., 2008; Niu et al., 2014), incluindo os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus spp.*, como produtos do seu metabolismo de hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta (Featherstone, 2008; Melo et al., 2008). No entanto, para o desenvolvimento da lesão de cárie é necessária a presença de bactérias, mas esta condição não é suficiente (Melo et al., 2008; Sala & García, 2013). É necessário que, num hospedeiro suscetível, ocorra um desequilíbrio entre os fatores protetores e os patológicos por um determinado período de tempo, que provoca uma rutura no processo fisiológico da remineralização e desmineralização da estrutura dentária resultando na dissolução dos cristais de HA pela perda de minerais para o meio envolvente (Melo et al., 2008; Cochrane et al., 2010; Oliveira et al., 2014; Memarpour et al., 2015).

Se o aumento de volume da placa bacteriana e a frequência de consumo de açúcares não forem controlados durante longos períodos de tempo, a perda mineral sobrepõe-se ao seu ganho, ou seja, em condições patológicas, a desmineralização prevalece em relação à remineralização (Niu et al., 2014; West & Joiner, 2014).

Se o pH retornar a valores acima de 5,5 pela remoção do biofilme, pela diminuição do consumo de açúcar ou mesmo pela capacidade tampão da saliva, a perda mineral poderá ser interrompida, ou mesmo revertida (Melo et al., 2008).

1.2.3 Aspetos Histológicos

A cárie desenvolve-se gradualmente, iniciando-se por apenas uma mínima alteração a nível estrutural, não detetável a nível clínico, progredindo para um estado de desmineralização clinicamente visível, podendo alcançar graves níveis de destruição da estrutura dentária (Llena et al., 2015).

Como referido anteriormente, os cristais de hidroxiapatite contêm várias impurezas e inclusões de iões diferentes do próprio cristal. A substituição do carbonato pelo fosfato é a que torna o cristal de hidroxiapatite mais solúvel e mais propenso à desmineralização pela ação dos ácidos, levando à existência de zonas com deficiência de cálcio (Featherstone, 2008; Lussi et al., 2011). Após o metabolismo dos hidratos de carbono pelas bactérias cariogénicas presentes na cavidade oral, libertam-se ácidos orgânicos que se difundem pelo espaço intercrystalino. Posteriormente, quando o ácido atinge uma zona suscetível do cristal, iões de cálcio e fosfato são libertados para este espaço (Featherstone, 2008).

No primeiro estágio da cárie, a desmineralização traduz-se num aumento dos poros intercrystalinos ao nível da subsuperfície por perda de cerca de 50% de mineral. Nesta fase, a superfície do esmalte encontra-se relativamente intacta alterando apenas a sua tonalidade (Melo et al., 2008; Pino, Ar, Prado, & Tard, 2014).

Quando o processo de desmineralização não é controlado, este pode continuar até atingir a dentina, destruindo gradualmente a estrutura dentária (Melo et al., 2008)

1.2.4 Classificação

A cárie classifica-se em função da sua localização anatómica e atividade que não reflete uma composição química da estrutura dentária mais suscetível, mas sim a localização de placa bacteriana metabolicamente ativa (Sala & García, 2013).

O primeiro sinal de cárie é designado como lesão de *white spot* que tem sido, também, denominado como cárie incipiente (Fejerskov et al., 2015).

A lesão de cárie pode ocorrer ao nível da coroa, afetando o esmalte (cárie coronal), ou ao nível da raiz (cárie radicular), quando esta se encontra exposta, afetando o cemento e a dentina (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015). A cárie também pode ser classificada como cárie primária se ocorrer em superfícies íntegras, ou cárie secundária ou recidivante, caso surja sob uma restauração previamente realizada (Fejerskov et al., 2015). Uma importante forma de classificação da lesão de cárie é, também, quanto à sua atividade: ativa ou inativa. Baseando-se em avaliações prévias, uma cárie que esteja em progressão é designada como ativa; uma lesão de cárie que não tenha sofrido alterações e não tenha progredido é dada como inativa. Esta distinção é muito importante, uma vez que, se a cárie estiver inativa, não é necessária qualquer intervenção e apenas um controlo para detetar possíveis alterações é suficiente (Fejerskov et al., 2015).

Existem, também, cáries rampantes que afetam particularmente crianças ou pacientes que sejam submetidos a tratamentos com radiação, e são caracterizadas por serem múltiplas e se localizarem em zonas que normalmente não apresentam lesões de cárie. As cáries ocultas ou *hidden caries* são aquelas que se desenvolvem em dentina e cuja detecção não é fácil, requerendo um exame radiográfico (Fejerskov et al., 2015).

I.2.5 Potencial cariogénico

A cariogenicidade da dieta é determinada pela presença de hidratos de carbono que servem de substrato para as bactérias cariogénicas que sintetizam polissacarídeos extracelulares e produzem ácidos orgânicos, resultando na desmineralização do esmalte (Lima, 2007). Os hidratos de carbono podem ser diferenciados em monossacáridos (glucose, galactose e frutose), oligossacáridos (sacarose, lactose e maltose) ou polissacáridos (amido, amilose e amilopectina). São os monossacáridos que desenvolvem mais rapidamente a lesão de cárie, mas também a combinação do amido com a sacarose apresenta elevada cariogenicidade (Sala & García, 2013). O potencial cariogénico da dieta pode ser influenciado por factores do próprio alimento como a quantidade e tipo de hidratos de carbono presentes, pH, consistência, retenção, frequência, horário de ingestão, propriedades sialogénicas e presença de fatores modificadores da solubilidade do esmalte como ácidos. Pode ser também influenciado por fatores socio-económicos como a disponibilidade, distribuição e *marketing* dos alimentos (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015).

Para o desenvolvimento da lesão de cárie, as bactérias possuem certas características que aumentam, também, o potencial cariogénico. A sua virulência é dada pela capacidade de transportar rapidamente açúcares fermentáveis e convertê-los em ácidos pelo facto de certas bactérias como o *Streptococcus mutans* apresentarem sistemas de transporte que conseguem metabolizar açúcares mesmo quando em baixas concentrações na cavidade oral; e capacidade de tolerar condições ácidas, adaptando-se e modificando a sua expressão fenotípica para aumentar a produção de ácidos (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015)

I.2.6 Prevalência

Patologias orais como a cárie dentária e a doença periodontal continuam a ser uma das doenças mais prevalentes que afeta o ser humano em todo o mundo (Melo et al., 2008;

Sala & García, 2013; Veiga, Pereira, & Amaral, 2015). Estas condições patológicas estão associadas a uma diminuída qualidade de vida, com repercussões sócio-económicas pelo elevado custo do seu tratamento (Melo et al., 2008; Veiga et al., 2015). A prevalência tem vindo a diminuir na maioria dos países desenvolvidos, no entanto, nos países subdesenvolvidos e em certas etnias e grupos populacionais mais desfavorecidos dos países industrializados, a doença continua a ter uma alta prevalência (Veiga et al., 2015).

A principal explicação para o facto da cárie dentária continuar a ser uma doença prevalente reside no acesso limitado aos cuidados de saúde, principalmente dos residentes de áreas suburbanas, à falta de higiene oral e ao baixo nível educacional (Veiga et al., 2015). Num estudo realizado em Portugal em 2015, foram avaliadas 605 crianças, com idades compreendidas entre os 5 e os 12 anos, que apresentaram uma prevalência de cárie de 72,1%, das quais 47,0% apresentaram mais de 3 cáries, 42,2% viviam em zonas suburbanas e apenas menos de metade das crianças (41,4%) tinham tido uma só consulta de medicina dentária no último ano (Veiga et al., 2015).

Segundo uma revisão sistemática realizada em Londres, em 2015, a prevalência global de cáries não tratadas na dentição permanente em 2010, foi de 35% correspondendo a 2,4 mil milhões de pessoas; e a prevalência de cárie não tratada na dentição decídua em 2010 foi de 9%. Ambos os resultados foram comparados com valores obtidos em 1990, constatando-se que permaneceram estáticos, concluindo que a cárie continua a ser um problema *major* na maioria dos países do mundo (Kassebaum et al., 2015). Diversas populações do mesmo país ou entre países encontram-se em patamares diferentes de prevalência de cárie, pelo que as atitudes a adotar deverão ser individualizadas e implementadas em função dos valores encontrados em cada população e país (Melo et al., 2008).

1.2.7 Incidência

Um estudo longitudinal realizado durante 10 anos na Suécia, constatou que, dos 102 participantes com mais de 65 anos, apenas 5 não apresentaram novos casos de cárie durante esse período de tempo. Os outros participantes apresentaram um elevado aumento de cáries, principalmente radiculares (Fejerskov et al., 2015).

Em 2015, foi realizado um estudo longitudinal no Brasil que incluía 381 crianças com idades compreendidas entre 1 e 5 anos, das quais 184 apresentavam cáries e 197 não apresentavam cáries. Foi feita uma avaliação de presença de cáries num intervalo de 2

anos e constatou-se que a incidência geral da cárie era de 46,6%, sendo que os valores mais altos foram encontrados no grupo de crianças que apresentavam cáries na avaliação inicial (61,1%). 36,7% do grupo de crianças que não apresentava cáries na primeira avaliação, exibiu lesões de cárie no segundo exame. Concluiu-se que crianças que apresentam lesões de cárie apresentam um maior risco de desenvolver novas lesões de cárie (Corrêa-Faria, Paixão-Gonçalves, Paiva, & Pordeus, 2015).

1.2.8 Manifestações Clínicas

A lesão de cárie manifesta-se inicialmente por uma lesão de mancha branca denominada: *white spot lesion* (WSL). As WSL são o primeiro sinal clínico visível a olho nu da cárie dentária e são caracterizadas por serem manchas bem definidas, diferenciadas do esmalte, aleatoriamente distribuídas estando muitas vezes localizadas no centro do dente (Bishara & Ostby, 2008; Sala & García, 2013). A mancha branca deve-se à perda mineral subsequente da desmineralização que leva a alterações das propriedades óticas, resultando num esmalte de aparência opaca e esbranquiçada pela diminuição da translucidez (Bishara & Ostby, 2008; Pino et al., 2014). A translucidez do esmalte é um fenómeno ótico que depende do tamanho do espaço intercrystalino, sendo que em estágios iniciais é necessária a secagem com ar para esta poder ser visível e com o desenvolvimento da lesão e, conseqüente aumento do espaço intercrystalino, a WSL torna-se visível sem qualquer secagem. Esta translucidez dá-se pela substituição do ar pela água que circunda os prismas de esmalte (Torres, Borges, Torres, Gomes, & Oliveira, 2011).

Durante o curso natural da doença, ao longo do tempo, e com o decorrer do processo de desmineralização, a lesão de cárie agrava-se e dissipa-se para o esmalte remanescente, até chegar à dentina e, eventualmente, à polpa. Quando a cárie se encontra inativa e localizada no esmalte, ao nível das superfícies livres, esta apresenta-se com cor branca, superfície lisa, dura e brilhante. Quando a lesão de cárie se encontra no esmalte ao nível do sistema fissurário e inativa, esta apresenta-se com uma cor escura e com superfície lisa. Quando a lesão atinge a dentina e está ativa esta apresenta-se com uma cor amarela ou castanha clara, consistência mole e superfície rugosa. Quando está inativa e na dentina, surge com uma superfície dura e lisa e de cor castanha escura ou preta (Sala & García, 2013).

Existem outras lesões de mancha branca que devem ser distinguidas das WSL como as manchas de fluorose ou as hipoplasias de esmalte. Ao contrário das manchas de *white spot*, a fluorose traduz-se pela presença de manchas indefinidas, indiferenciadas do esmalte e distribuídas de forma simétrica (Bishara & Ostby, 2008). As hipoplasias do esmalte, definidas pela incompleta ou deficiente formação do esmalte, apresentam-se como manchas brancas ou com descoloração do dente, variando de amarelo a castanho escuro, de superfície rugosa e irregular e podem apresentar sulcos ou depressões com exposição de dentina pela ausência parcial ou total do esmalte (Souza et al., 2009).

1.2.9 Distribuição

Uma vez que as lesões de cárie ocorrem onde há uma maior acumulação de placa bacteriana ativa, estas podem ser encontradas em qualquer superfície do dente (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015). As fossas e fissuras, as faces interproximais e a margem gengival são as zonas mais afetadas uma vez que são mais favoráveis à retenção de placa bacteriana e de difícil acesso para a higienização (Fejerskov et al., 2015). No entanto, também podem ser encontradas ao nível das faces vestibulares e linguais/palatinas que, quando ocorrem, indicam um elevado risco de cárie, e nas superfícies radiculares quando se encontram expostas (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015).

1.2.10 Diagnóstico e Índices de Classificação

Para a realização de um correto diagnóstico é fundamental o conhecimento das características clínicas tendo em conta a sua localização, o estadio e a progressão, permitindo estabelecer a presença ou ausência de lesão de cárie (Sala & García, 2013).

O diagnóstico das lesões de cárie é fundamental para detetar a doença, avaliar o prognóstico, contribuir para a decisão clínica, informar o paciente e monitorizar o desenvolvimento da doença (Fejerskov et al., 2015).

Existem duas formas de diagnóstico de lesões de cárie: o epidemiológico e o clínico. Enquanto o diagnóstico epidemiológico limita-se a detetar lesões e a classificá-las, o diagnóstico clínico avalia a evolução da história, atividade e risco de cáries, estando condicionado pela decisão terapêutica. Ao contrário do diagnóstico epidemiológico, o diagnóstico clínico não é standarizado, não sendo um método objetivo (Sala & García, 2013).

O diagnóstico clínico da cárie é realizado através do exame visual e tátil das superfícies dentárias com o auxílio de uma sonda (Selwitz et al., 2007; Sala & García, 2013) e, para isso, a superfície deve estar limpa, seca e bem iluminada (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015). Outros métodos de diagnóstico incluem a radiografia, a transiluminação com fibra ótica e sistemas baseados na fluorescência como o DIAGNOdent ou o VistaProof. Estes métodos exibem uma maior objetividade na detecção de lesões de cárie, no entanto, não são aplicáveis a todas as superfícies dentárias e podem ter um elevado custo (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015).

Em 1997, Pitts esquematizou graficamente os vários estádios da lesão de cárie em função da sua gravidade – *iceberg* da cárie dentária. Esta representação, divide a lesão de cárie em diferentes etapas do diagnóstico iniciando-se, na base, com as lesões subclínicas e lesões que apenas são detetáveis a nível radiográfico; seguindo-se de lesões clinicamente detetáveis com a superfície intacta, onde se insere a lesão de *white spot*; acima encontram-se as lesões cavitadas que são divididas em cavitação do esmalte ou cavitação da dentina; e, por fim, no topo do esquema encontram-se todas as lesões que afetam a polpa dentária (Sala & García, 2013).

Esta esquematização representa ainda as possibilidades de tratamento adequado para cada tipo de lesão, conforme o grau de destruição e o tipo de atividade (Sala & García, 2013).

Em 1999, Nyvad desenvolveu um novo sistema de diagnóstico que diferenciava lesões ativas de lesões inativas de acordo com um conjunto de critérios táteis e visuais. Este sistema categoriza a gravidade das lesões em três níveis: superfície intacta, descontinuidade superficial do esmalte e cavidade evidente na dentina. A atividade das lesões é determinada através de sinais clínicos como a cor, textura e brilho, sendo o critério de diagnóstico essencialmente visual e tátil pelo uso da sonda que determina a textura da superfície (Sala & García, 2013).

O ICDAS II (*International Caries Detection and Assessment System II*) é outro índice classificativo e é um exemplo de um método de detecção e diagnóstico baseado na avaliação do estado da lesão e do dente ou restauração (Fejerskov et al., 2015). Este índice classifica a cárie através de dois dígitos: o primeiro refere-se ao estado da superfície do dente, se está íntegra ou restaurada, e o segundo relaciona-se com a presença ou não de cárie e o seu estado (Sala & García, 2013). As tabelas 1 e 2 ilustram os diferentes códigos utilizados neste índice. Por exemplo, se um dente não está restaurado nem selado, mas

apresenta uma cárie cavitada sem exposição de dentina, o dente é classificado como 04; se um dente apresenta uma restauração a amálgama infiltrada é classificado como 43.

Tabela 1 - Critérios associados à integridade ou à presença de restaurações no dente, baseados no ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System*).

Códigos	Descrição dos critérios clínicos
Código 0	Não restaurado nem selado
Código 1	Parcialmente selado
Código 2	Totalmente selado
Código 3	Restauração da cor do dente
Código 4	Restauração a amálgama
Código 5	Coroa metálica
Código 6	Coroa cerâmica, em ouro metalo-cerâmica ou faceta
Código 7	Restauração fraturada ou perdida
Código 8	Restauração provisória

Tabela 2 – Critérios associados à presença ou não de cárie e ao seu estado, baseados no ICDAS (*International Caries Detection and Assessment System*).

Códigos	Descrição dos critérios clínicos
Código 0	Esmalte saudável
Código 1	Alterações de esmalte visíveis com esmalte seco
Código 2	Alterações inequívocas de esmalte visíveis
Código 3	Cavidade do esmalte sem dentina visível
Código 4	Sombra escura de dentina vista do esmalte sem cavidade
Código 5	Cavidade com exposição da dentina
Código 6	Extensa cavidade com exposição da dentina

1.2.11 Indução Artificial de Lesões de Cárie

A indução de lesões iniciais de cárie tem sido muito utilizada como modelo de estudo para o estudo do processo cariioso. Estes estudos utilizam ciclos de pH e agentes desmineralizantes para reproduzir ataques cariogénicos. No entanto, devido à ausência de microorganismos, não é totalmente conseguida a reprodução das condições naturais da cavidade oral, apenas refletindo os aspetos físico-químicos da desmineralização do

esmalte (Campos et al., 2015). Para além disso, existem variações da composição do esmalte humano, podendo haver diferenças na desmineralização entre diferentes espécimes e entre locais do mesmo espécime (Mohammed et al., 2014).

Por outro lado, as WSL induzidas artificialmente são mais homogeneamente reprodutíveis do que as lesões de cárie naturais, uma vez que podem ser produzidas lesões de cárie com uma profundidade constante facilitando o estudo dos fenómenos da desmineralização e remineralização (Damle, Bengude, & Saini, 2010).

Desta forma, uma vez que é necessário avaliar o potencial remineralizante de certos produtos antes de serem aplicados aos pacientes, os estudos *in vitro* são fundamentais, oferecendo informações sobre condições que não são possíveis avaliar em estudos clínicos (Neto et al., 2009).

1.2.12 Prevenção e Remineralização das Lesões Cariogénicas

No início da segunda metade do século XX, quando o processo de desenvolvimento da cárie começou a ser melhor entendido, desenvolveram-se os primeiros programas para combater esta doença como a fluoretação das águas de consumo e a aplicação de medidas que interferiam com os hábitos alimentares e de higiene oral. Outras medidas preventivas foram aplicadas mais tarde como a aplicação de selantes de fissura e pastas dentífricas fluoretadas (Melo et al., 2008).

A prevenção primária passa por manter o equilíbrio fisiológico, ao controlar a dieta, manter os hábitos de higiene oral adequados, pelo controlo mecânico da placa bacteriana, e realizar visitas regulares ao médico dentista (Sala & García, 2013; Fejerskov et al., 2015). O controlo mecânico da placa deve ser realizado regularmente, pela escovagem dentária diária, uso de fio dentário e/ou escovilhões, e pela realização de bochechos com antimicrobianos (Sala & García, 2013).

Sabe-se que um bom cuidado da cavidade oral durante a infância, reduz significativamente o risco de patologias orais no futuro (Veiga et al., 2015).

Quando a prevenção primária não é eficaz, passa-se de um estado de equilíbrio para um estado patológico em que a prevenção secundária deve intervir, devendo-se diagnosticar precocemente e executar um tratamento atempado. Na prevenção terciária, a cárie já está instalada e avançada, devendo-se recorrer a tratamentos invasivos (Fejerskov et al., 2015).

Tradicionalmente, a intervenção no tratamento de lesões de cárie, cavitadas ou não, passava pela sua imediata remoção e substituição por materiais restauradores (Stewart & Hale, 2003), o que produzia uma grande perda de estrutura dentária, por vezes desnecessária.

Hoje em dia, a filosofia da medicina dentária preventiva não invasiva ou minimamente invasiva é direcionada para o uso de tratamentos que controlam ou revertem lesões de cárie incipientes, mantendo o dente saudável e funcional. Uma vez que, nem todas as lesões de cárie avançam para cavitação, o desafio é determinar quais as WSL que progridem para cavitação e avaliá-las de forma adequada para tomar decisões clínicas apropriadas (Elkassas & Arafa, 2013; Pino et al., 2014; Lenzi, Montagner, Soares, & de Oliveira Rocha, 2015).

Atualmente, as várias estratégias para controlar a cárie dentária focam-se na interrupção da interação entre todos os fatores de risco que têm um importante papel no desenvolvimento da cárie dentária. Algumas destas medidas incluem alterações na dieta, práticas de higiene oral, uso de produtos fluoretados, selantes de fossas e fissuras e aplicação de agentes antimicrobianos. Porém, todas as estratégias implementadas até agora, baseadas no controlo desses fatores, apenas diminuíram a incidência de cárie sem, no entanto, erradicá-la (Lima, 2007; Farooq et al., 2013).

Idealmente, os agentes de remineralização devem proporcionar uma biodisponibilidade de iões cálcio, fosfato e fluoreto que favoreça o ganho mineral em profundidade na lesão e não apenas a sua deposição a nível superficial (Cochrane et al., 2010).

Portanto, o agente remineralizador deve ter como requisitos básicos: segurança para o uso humano, biodisponibilidade dos iões, precipitação rápida sobre as regiões desmineralizadas, proporcionar a formação de apatite estável e resistente a futuros ataques ácidos e apresentar uma capacidade de difusão pelo biofilme e pela subsuperfície da lesão (Nongonierma & FitzGerald, 2012).

O Flúor como agente remineralizador

Existem circunstâncias em que o risco de cárie é elevado e as condições naturais da cavidade oral não são suficientes para reverter a desmineralização, pelo qual se tem que recorrer a elementos externos tais como os produtos fluoretados (Carmona-Arango et al., 2013).

Após a aplicação tópica de flúor precipitam-se complexos de CaF_2 que funcionam como uma barreira protetora na superfície e como reservatórios do íon fluoreto (Mohammed et al., 2014). Quando o pH diminui, o flúor livre dos depósitos de CaF_2 liberta-se inibindo o processo de desmineralização. Ao aumentar o pH, os íões de flúor livres penetram na superfície porosa do esmalte e são utilizados para a formação de mineral (Li et al., 2014; Memarpour et al., 2015).

Assim, há uma redução da quantidade de minerais perdidos aquando do fenómeno da desmineralização e um aumento da resposta aquando da remineralização salivar. A formação de mineral ocorre pela substituição de íões de hidroxilo (OH^-) do cristal de HA, com a fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$, por íões de flúor (F^-), resultando em cristais de FA, com a fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, que possuem menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido comparativamente à estrutura original de HA, uma vez que o pH crítico para a dissolução do esmalte remineralizado com FA é de 4,5 (Sudjalim, Woods, & Manton, 2006; Chen & Wang, 2011; Mohammed et al., 2014;).

Pelo facto do fluoreto poder ser integrado na rede cristalina do esmalte dentário resultando numa estrutura que é mais resistente à dissolução pelos ácidos, a administração de flúor tópico é amplamente utilizada como recurso para o tratamento de lesões de cárie incipientes (Sudjalim et al., 2006).

O flúor é considerado um clássico agente “anti-cárie” (Xiang et al., 2012) que interage com os fluidos orais na superfície e subsuperfície do esmalte e que se combina com os íões de cálcio e fosfato, libertados aquando da desmineralização do esmalte, para substituir HA por FA (Li et al., 2014; Oliveira et al., 2014) sendo a sua capacidade remineralizadora reconhecida (Memarpour et al., 2015).

Por cada dois íões de flúor, são necessários seis íões de fosfato e dez de cálcio para formar uma molécula unitária de FA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Assim, na aplicação tópica de flúor, a biodisponibilidade de íões de cálcio e fosfato pode ser o fator limitativo da remineralização do esmalte (Reynolds, 2008; Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014).

Formas de aplicação de flúor

Há mais de 50 anos, desde a introdução da água fluoretada, que a terapia com flúor tem sido o foco nas estratégias preventivas da saúde oral (Xiang et al., 2012). A aplicação sistémica de flúor através de, por exemplo, administração de comprimidos, não tem uma ação significativa na diminuição da desmineralização e aumento da remineralização.

Assim, a tentativa de prevenção e de reversão de lesões iniciais de cárie direciona-se para o uso tópico de flúor visto que são de fácil uso e têm aceitabilidade por parte dos pacientes (Shen et al., 2015). Pastas dentífricas, géis, vernizes e colutórios são as formas mais comuns de aplicação tópica de flúor (Duraismy et al., 2015; Memarpour et al., 2015).

Pastas Dentífricas Fluoretadas

As pastas dentífricas fluoretadas são consideradas um dos agentes mais efetivos para prevenir e reverter a desmineralização do esmalte, sendo que o flúor é o principal componente do dentífrico comprovadamente associado ao declínio da incidência de cárie (Jo et al., 2014).

Durante a escovagem com uma pasta fluoretada, o flúor pode ser distribuído às diferentes áreas da cavidade oral como a superfície dentária, a saliva, tecidos moles e o biofilme formando-se reservatórios de CaF_2 que ajudam na posterior formação de cristais de FA, proporcionando a remineralização (Li et al., 2014; Shen et al., 2015).

A eficácia da pasta dentífrica convencional (1.000 ppm de flúor) tem sido documentada em vários estudos; a evidência refere que pastas dentífricas com 5.000 ppm de flúor podem também promover a redução da desmineralização e o aumento da remineralização. No entanto, a completa eliminação de WSL é improvável pela rápida remineralização da superfície de esmalte na presença de uma elevada concentração de flúor, que restringe a passagem de iões em profundidade às camadas mais afetadas. Assim, a aplicação direta de grandes concentrações de flúor não é recomendada (Jo et al., 2014).

Segundo Damle et al. (2010), o uso regular de pastas dentífricas fluoretadas aumenta a remineralização de WSL.

Vernizes fluoretados

A aplicação tópica de flúor com vernizes tem sido usada como adjuvante no tratamento de lesões ativas de *white spot*. A evidência do efeito dos fluoretos tópicos na prevenção de cáries tem sido extensamente reportada, apresentando um benefício para a aplicação de verniz de flúor pelo menos duas vezes por ano para a prevenção de cáries em crianças e adultos com moderado ou alto risco de cárie (Lenzi et al., 2015; Shen et al., 2015).

Vários estudos demonstraram que vernizes de flúor são capazes de prevenir ou até remineralizar lesões iniciais de cárie quando combinados com outras estratégias

preventivas como o controlo da dieta e do biofilme (Du et al., 2012; Silva et al., 2012). O verniz mais efetivo reportado na literatura é o que contém fluoreto de sódio como agente anti-cariogénico (Cardoso et al., 2014).

Os vernizes dentários são uma estratégia utilizada na aplicação tópica de flúor para controlar cáries e apresentam diversas vantagens em relação às outras formas de aplicação de flúor: não são afetados pela humidade, endurecem sobre o dente em contacto com a saliva, o que ajuda na sua retenção, permanecendo aderidos durante mais tempo ao esmalte e não dependem da cooperação do paciente, permitindo uma maior aceitabilidade (Duraismy et al., 2015; Llena et al., 2015).

Apresentam um curto período de tempo na cavidade oral uma vez que podem ser eliminados pela ação da língua, do fluxo salivar, da mastigação ou dos procedimentos de higiene oral. Assim sendo, os vernizes devem libertar os seus iões no curto espaço de tempo antes de serem totalmente eliminados. Foi estimado que os vernizes de flúor permanecem durante 24 horas *in situ* (Shen et al., 2015).

A ação remineralizadora dos vernizes de flúor pode ser explicada pela presença de reservatórios de flúor pela formação de CaF_2 e pela sua lenta libertação a níveis de pH diminuídos para reduzir o processo de desmineralização (Li et al., 2014). No entanto, a formação destes reservatórios de CaF_2 e dos cristais de fluorapatite é limitada pela biodisponibilidade de iões de cálcio, fosfato e flúor (Reynolds, 2008; Elkassas & Arafa, 2013; Shen et al., 2015).

Por conseguinte, tentou-se incluir iões de cálcio e fosfato em vernizes de flúor com o objetivo de melhorar a sua eficácia, criando-se vernizes de flúor com fosfato de cálcio (*ClinproTM White Varnish*) pela adição de fTCP (Shen et al., 2015) que resulta da combinação de fosfato, cálcio e de fluoreto de sódio a 5% (Memarpour et al., 2015). O fTCP, por sua vez, resulta da mistura do fosfato de cálcio com lauril sulfato de sódio (Jo et al., 2014).

No entanto, a adição de iões de cálcio e fosfato pode levar ao efeito contrário ao desejado uma vez que o fosfato inorgânico pode dificultar a retenção dos iões de flúor impedindo a formação de CaF_2 . Pode, também, levar à formação de fases de fosfato de cálcio com baixa solubilidade diminuindo a sua biodisponibilidade e favorecendo a formação de cálculo dentário (Shen et al., 2010; Shen et al., 2015).

O CPP-ACP

Recentemente, foram criados novos métodos preventivos que visam potencializar

o efeito da remineralização obtida por meio do flúor, pela aplicação de íons de fosfato e cálcio que conseguem penetrar em profundidade nas WSL, tal como o CPP-ACP (Jo et al., 2014).

O uso clínico de cálcio e fosfato, para a remineralização, não tem sido bem-sucedido pela baixa solubilidade do fosfato de cálcio, especialmente na presença de íons de flúor (Reynolds, 2008).

No entanto, a caseína fosfopeptídea (*Casein Phosphopeptide* – CPP) é capaz de ligar íons de cálcio e fosfato, estabilizá-los como fosfato de cálcio amorfo (*Amorphous Calcium Phosphate* - ACP), formando-se nanocomplexos de CPP-ACP que se ligam à superfície do dente e ao biofilme (Reynolds, 2008; Duraisamy et al., 2015; Memarpour et al., 2015). Durante um ataque ácido o CPP-ACP dissocia-se em íons de fosfato e de cálcio e, como consequência, a estrutura dentária passa a beneficiar de uma supersaturação co-localizada de íons de cálcio e fosfato no biofilme que se difundem para as lesões de esmalte subsuperficiais (Zhang, Zou, Yang, & Zhou, 2011; Farooq et al., 2013; Memarpour et al., 2015), proporcionando assim o processo de remineralização (Reynolds, 2008; Oliveira et al., 2014; Memarpour et al., 2015).

O CPP é derivado de uma proteína de leite designada caseína, é insípida, tem baixa antigenicidade e pode ser purificada em nano-complexos de CPP-ACP por precipitação seletiva, troca de íons ou por ultrafiltração (J. Li et al., 2014). Possui uma sequência específica de aminoácidos -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu que estabiliza o ACP em solução metaestável (Reynolds, 2008). Tem, também, a capacidade de diminuir a quantidade de *Streptococcus mutans* pela sua possibilidade de se integrar no biofilme (Farooq et al., 2013).

Diversos estudos *in vitro* e *in situ* demonstraram um importante papel do CPP-ACP na reversão de lesões iniciais de *white spot* (Reynolds, 2008; Zhang et al., 2011; Duraisamy et al., 2015; Memarpour et al., 2015) e uma maior ação na neutralização de ácidos da cavidade oral quando comparado com a aplicação de apenas pasta dentífrica fluoretada (Farooq et al., 2013).

No entanto, nos estudos *in vitro*, o CPP-ACP tem algumas limitações: ao ser aplicado sem flúor apenas leva ao aumento das concentrações de íons de fosfato e de cálcio e não de flúor, necessário também à remineralização; não é conhecido o tempo total de ação do CPP-ACP (Farooq et al., 2013).

Combinação do CPP-ACP com Flúor

Para uma remineralização eficaz é necessária a coexistência de íões de flúor, cálcio e fosfato. Assim, o flúor ou o fosfato de cálcio quando aplicados individualmente não são tão eficazes na remineralização quando comparado com a sua aplicação combinada (Reynolds, 2008; Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013).

A combinação de flúor com CPP-ACP, independentemente da sequência da aplicação (Duraismy et al., 2015), mostrou uma maior eficiência na remineralização do que produtos que tinham apenas flúor na sua constituição e do que apenas CPP-ACP sem flúor (Reynolds, 2008; Duraismy et al., 2015; Llena et al., 2015).

Isto porque, quando se combina a aplicação de flúor com CPP-ACP, formam-se nanocomplexos de íões de cálcio, fosfato e flúor designados por CPP-ACFP. O ACFP é estabilizado pelo CPP na superfície do dente (Li et al., 2014) e, desta forma, é possível a coexistência de cálcio, fosfato e flúor na superfície do esmalte, promovendo todos os elementos necessários à remineralização com FA (Reynolds, 2008). Assim, é proporcionado um efeito sinérgico do CPP-ACP e do flúor no controlo e tratamento das WSL promovendo um efeito inibitório na desmineralização do esmalte (Li et al., 2014; Duraismy et al., 2015).

I.3 PERTINÊNCIA DO ESTUDO

A cárie dentária é uma doença crónica e qualquer indivíduo pode estar suscetível ao seu desenvolvimento em qualquer altura da sua vida. Apesar de não ser fatal, causa morbidade, influencia desfavoravelmente a saúde geral do indivíduo, sendo a principal causa de dor oral, e pode levar à perda total da peça dentária (Selwitz et al., 2007).

A cárie pode diminuir a função mastigatória, provocar perturbações fonéticas, alterar a estética facial, originar complicações infecciosas com repercussões locais e sistémicas e alterar a componente psicossocial do indivíduo (Robinson et al., 2000). Os problemas de saúde provocados pela cárie dentária podem também refletir problemas socioeconómicos pelo elevado custo do seu tratamento e pelo absentismo no trabalho (Melo et al., 2008).

A remineralização é um processo natural ou artificial de reparação do esmalte e já é estudada há muitos anos com o intuito de diminuir a incidência e prevalência da cárie. Uma vez que existe uma fase em que a lesão de cárie é reversível (Llena et al., 2015), deve-se atuar precocemente e de forma minimamente invasiva para controlar a progressão

da doença e melhorar a estética e a função (Cochrane et al., 2010). No início da segunda metade do século XX, quando foram descobertas as potencialidades cariostáticas do flúor, começaram a ser desenvolvidos programas para combater a cárie o que levou ao declínio da cárie dentária nos países industrializados. No entanto, estudos referem um aumento da incidência nestes países e uma elevada prevalência nos países subdesenvolvidos surgindo novas dúvidas quanto ao melhor meio para prevenir e tratar a cárie dentária (Melo et al., 2008).

O médico dentista deve ter conhecimento da etiologia, da fisiopatologia e da prevenção da cárie dentária, devendo estar a par das estratégias preventivas mais eficazes em cada caso específico, para informar e orientar o paciente de forma a evitar a progressão da cárie para cavitação e poder controlá-la mais facilmente.

I.4 OBJETIVOS

Com o presente trabalho pretendeu-se:

- Comparar a microdureza de superfície do esmalte humano, após indução artificial de cárie e aplicação de uma pasta dentífrica fluoretada;
- Comparar a microdureza de superfície do esmalte humano, após indução artificial de cárie e aplicação de verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio;
- Comparar a microdureza de superfície do esmalte humano, após indução artificial de cárie e aplicação de CPP-ACP;
- Analisar microscopicamente o efeito que a pasta dentífrica fluoretada tem sobre o esmalte humano, após indução artificial de cárie;
- Analisar microscopicamente o efeito que a combinação de pasta dentífrica fluoretada com verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio tem sobre o esmalte humano, após indução artificial de cárie;
- Analisar microscopicamente o efeito que a combinação de pasta dentífrica fluoretada com CPP-ACP tem sobre o esmalte humano, após indução artificial de cárie.

I.5 HIPÓTESE NULA

Para tal foi equacionada a seguinte hipótese:

- Não existem diferenças significativas no aspeto microscópico e na dureza superficial do esmalte após a aplicação dos distintos agentes remineralizadores sobre lesões iniciais de cárie.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de investigação foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz. Os dentes do estudo foram fornecidos pelo banco de dentes da Clínica Dentária Egas Moniz e preservados numa solução diluída de cloramina T a 0,5% e água desionizada a 4°C. Todos os dentes foram obtidos de sujeitos anónimos que assinaram um consentimento informado.

II.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado nas instalações do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, no laboratório de Biomateriais, entre junho e julho de 2016. A análise dos espécimes, pela Microscopia Eletrónica de Varrimento, foi efetuada no Laboratório de Microscopia Eletrónica no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa em julho de 2016.

II.3 DESENHO DO ESTUDO

Foi executado um estudo observacional e analítico em 12 molares humanos hígidos, sem cáries ou fraturas, dos quais foram obtidos 48 fragmentos de esmalte. Selecionaram-se 3 grupos de estudo: Grupo A (n=12), Grupo B (n=12) e Grupo C (n=12), que foram submetidos a um procedimento de desmineralização e, posteriormente, aplicadas diferentes estratégias de remineralização. Ao grupo controlo, Grupo D (n=12), não foi aplicado nenhum processo de desmineralização, nem nenhum agente terapêutico (Fig. 2).

II.4 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados, aleatoriamente, 12 molares íntegros que respeitassem os seguintes critérios de inclusão: hígidez, ausência de lesões de cárie, ausência de fraturas de esmalte e que não tivessem sido submetidos a tratamento químico ou mecânico prévio, à exceção dos contemplados na higiene dentária dos indivíduos. Deste modo, foram excluídos todos os dentes que apresentassem lesões de cárie, restaurações, fraturas,

malformações, perda de integridade ou que tivessem sido submetidos a tratamentos mecânicos (por exemplo, tratamento ortodôntico), químicos (como branqueamento) ou eletromagnéticos (por exemplo, radiação laser). Os critérios de inclusão foram visualmente observados, nesta fase inicial, através da lupa estereomicroscópica Leica TM MZ6 (Leica, Germany).

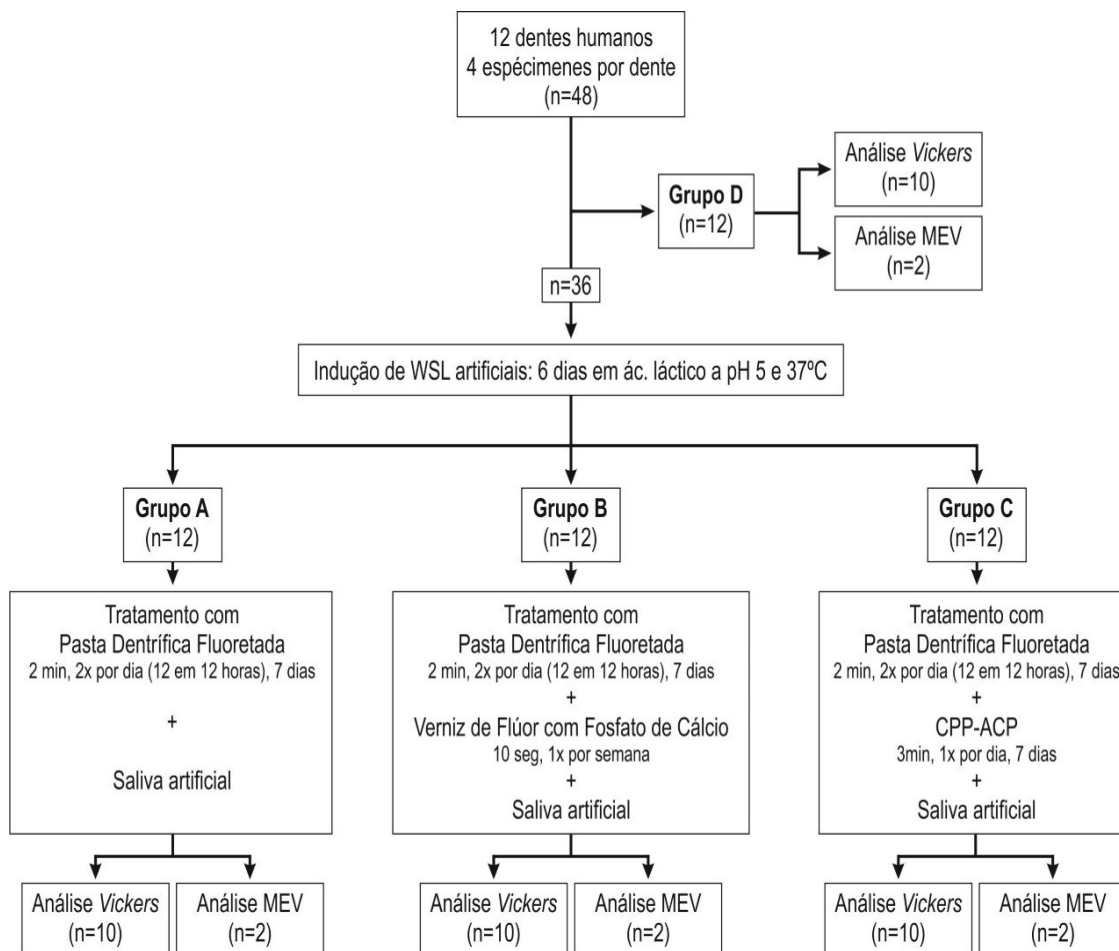


Figura 2 - Fluxograma do procedimento experimental.

II.5 PREPARAÇÃO E SECÇÃO DOS DENTES

Após a seleção da amostra, foi realizada a limpeza das superfícies das raízes dos dentes para a remoção de cálculo e restos de tecidos como o ligamento periodontal, com recurso a curetas periodontais Gracey 3/4 e 5/6 (Cardoso et al., 2014; Jo et al., 2014).

Para a secção dos dentes foi utilizado um micrótomo de tecidos duros, o Accutom-50 (Struers A/S, Ballerup, Dinamarca) (Fig. 3).



Figura 3- Máquina de corte de precisão Accutom-50 (Struers).

Cada dente foi seccionado no sentido mesio-distal, seguindo o sulco central da face oclusal (Fig. 4), de forma a obter dois fragmentos, um vestibular e um palatino/lingual (Fig. 5).



Figura 4 - Secção de um dente no sentido mesio-distal.



Figura 5 - Obtenção de dois fragmentos através da secção no sentido mesio-distal.

De seguida, cada um destes fragmentos obtidos foi novamente seccionado no sentido vestibulo-palatino/lingual (Fig. 6) em dois outros fragmentos (Fig. 7). Obtendo-se assim as porções mesio-vestibular, mesio-palatino/lingual, disto-vestibular e disto-palatino/lingual.

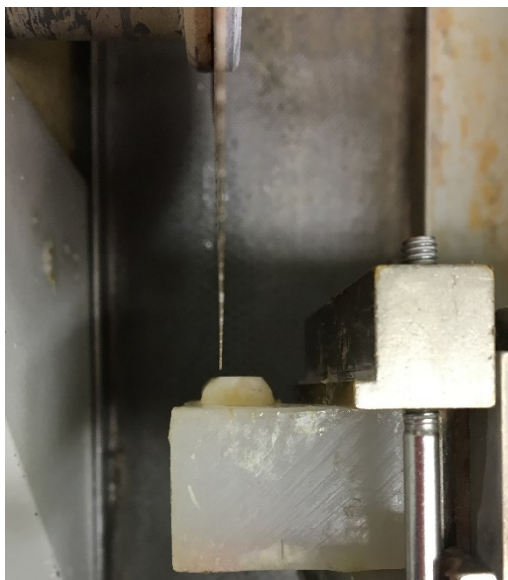


Figura 6 - Secção de um dente no sentido vestibulo-lingual.



Figura 7- Resultado da secção no sentido vestibulo-lingual.

As raízes foram cuidadosamente seccionadas ao nível da junção amelocementária, perpendicularmente ao longo eixo do dente (LED), separando a porção coronária da porção radicular (Fig. 8). Obtiveram-se assim 4 espécimenes por cada molar (Fig. 9), perfazendo um total de 48 espécimenes (n=48).

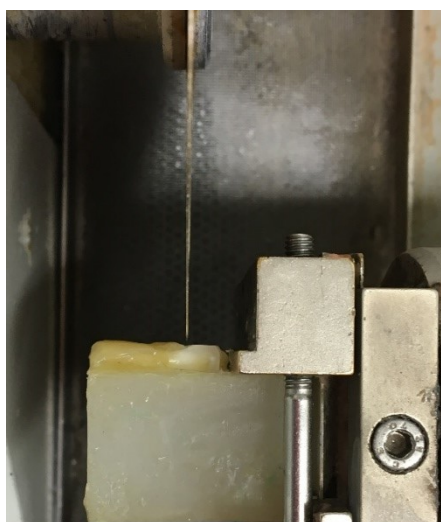


Figura 8 - Secção da raiz de um dente, perpendicularmente ao LED.

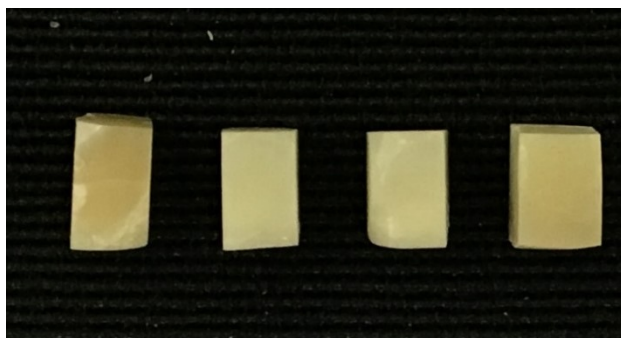


Figura 9- Obtenção, a partir de um molar, de quatros espécimenes com uma área de 3x4mm.

II.6 POLIMENTO DAS AMOSTRAS

Os espécimes submetidos à análise de microdureza e MEV, foram polidos com recurso à máquina LaboPol- 4® (WS Struers 18-B, Dinamarca) (Fig. 10) e aos discos de polimento a 40 rpm, sob arrefecimento com água. Os discos utilizados foram de grão fino de carbetto de silício, resistentes à água (StruersTM, FEPA paper, granulometria: 320, 600, e 1200 grits (Ionta et al., 2014). Os espécimes foram polidos até apresentarem uma superfície lisa e plana (Fig. 11, 12 e 13), necessária à análise de Microdureza Vickers (Schlueter et al., 2011). Os espécimes foram, posteriormente, colocados em água destilada para remover as partículas provenientes do polimento.



Figura 10 - Máquina LaboPol-4® (Struers) e disco de polimento.

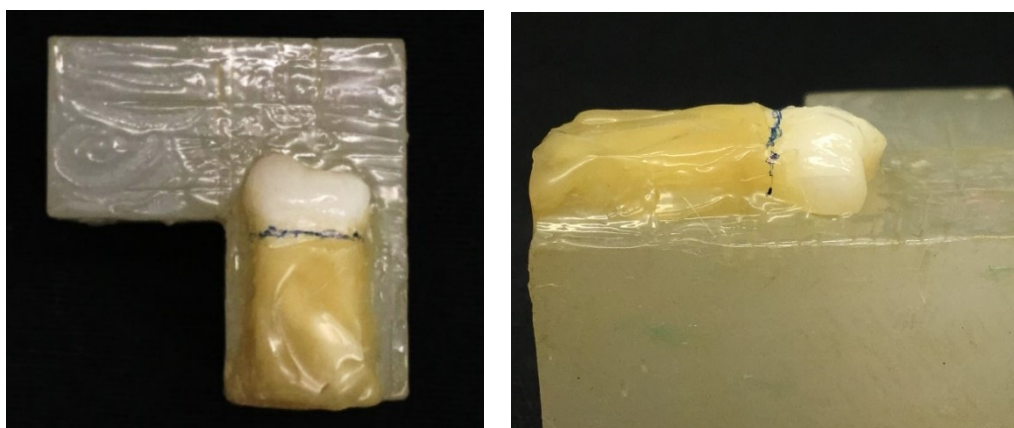


Figura 11 - Espécime antes de ser submetido ao polimento: (à esquerda) vista superior e (à direita) vista lateral.

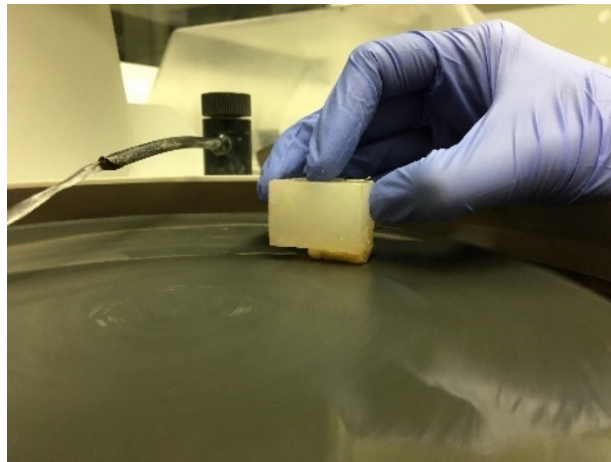


Figura 12 - Espécime submetido a polimento.

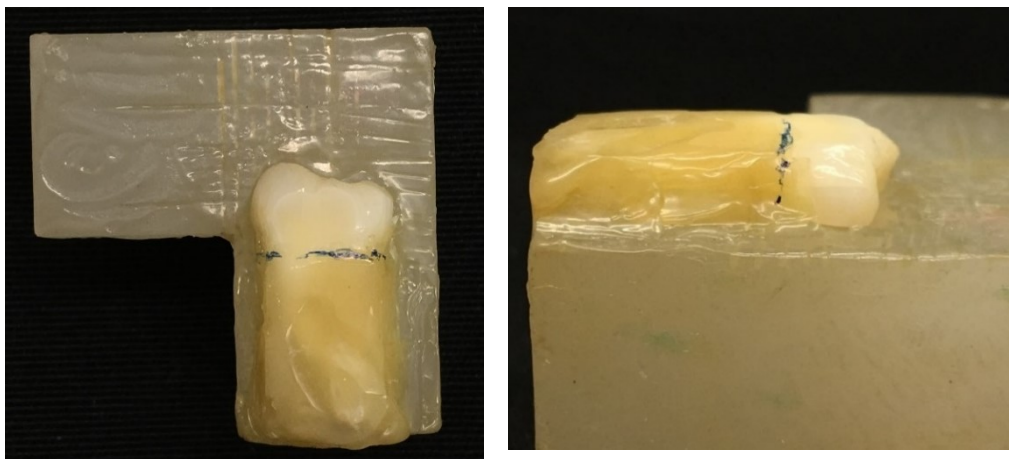


Figura 13 - Espécime após ser submetido ao polimento: (à esquerda) vista superior e (à direita) vista lateral.

II.7 INDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO SIMULANDO LESÕES ARTIFICIAIS DE *WHITE SPOT*

Para a indução de lesões artificiais de *white spot*, os 36 espécimes sofreram um processo de desmineralização com uma solução tampão de 50 mL de ácido láctico a pH 5 durante 6 dias (Cardoso et al., 2014), a uma temperatura de 37°C (Jo et al., 2014; Oliveira et al., 2014). A solução tampão de ácido láctico foi preparada com 50 mM de ácido láctico

(Fluka® Analytical, SIGMA – ALDRICH, Co., Espanha, lote: #BCBN4919V), tendo sido o pH ajustado a 5,0 com NaOH (LABORSPIRIT, Lisboa, Portugal, lote: #201011).

Foi utilizado ácido láctico, uma vez que é um dos produtos resultantes do metabolismo dos hidratos de carbono realizado pelas principais bactérias cariogénicas como o *Streptococcus mutans* e o *Lactobacillus spp* (Buzalaf et al., 2011; West & Joiner, 2014). O pH foi ajustado para 5, uma vez que o pH crítico a partir do qual o cristal de hidroxiapatite sofre desmineralização é 5,5 (García-Godoy & Hicks, 2008; West & Joiner, 2014).

II.8 ALEATORIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E APLICAÇÃO DOS AGENTES INDUTORES DE REMINERALIZAÇÃO

Após a indução das lesões artificiais de *white spot*, os 36 espécimes foram aleatoriamente divididos em três grupos de estudo: Grupo A (n=12), Grupo B (n=12) - e Grupo C (n=12). O Grupo D (n=12) constituiu o grupo controlo.

Durante e entre os ciclos de remineralização os espécimes dos três grupos de estudo, foram colocados numa solução de saliva artificial que foi preparada com 0,02 mM de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sulfito de sódio nano-hidratado), 6,84 mM de NaCl (cloreto de sódio), 5,36 mM de KCl (cloreto de potássio), 4,42 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (di-hidrogenofosfato de sódio di-hidratado), 16,65 mM de Ureia, 1,80 mM de CaCl_2 (cloreto de cálcio) e 1000 mL de água desionizada (Urban et al., 2009), apresentando um pH entre 6,9 e 7. No grupo controlo, os espécimes ficaram apenas armazenados em saliva artificial, durante o mesmo tempo em que decorreu o estudo (7 dias).

Grupo A (n=12) – Grupo de estudo

12 espécimes foram escovados com uma escova elétrica (*Oral-B, Vitality, Braun*) (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012) duas vezes por dia (8h00 e 20h00 - intervalo de 12h) durante 7 dias. A escovagem foi feita com pasta dentífrica fluoretada com 1450ppm NaF (*ColgateTM, Triple Action*) (Fig. 14) durante 2 minutos (Wang et al., 2011). Os espécimes foram colocados numa solução de saliva artificial e armazenados a 37°C (Duraismy et al., 2015) entre os ciclos de escovagem.

Destes, 10 espécimes foram submetidos a teste de microdureza de Vickers e 2 a MEV.



Figura 14 - Escova elétrica (*Oral-B, Vitality, Braun*) e pasta dentífrica fluoretada (1450 ppm de NaF) utilizadas na escovagem dos espécimes.

Grupo B (n=12) – Grupo de estudo

12 espécimes foram escovados com uma escova elétrica (*Oral-B, Vitality, Braun*) (Tschope & Meyer-Lueckel, 2012) duas vezes por dia (8h00 e 20h00 - intervalo de 12h) durante 7 dias. A escovagem foi feita com pasta dentífrica fluoretada com 1450ppm NaF (*ColgateTM, Triple Action*) (Wang et al., 2011).

No sétimo dia, secou-se a superfície do espécime e aplicou-se uma camada de verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (*ClinproTM White Varnish*, 3M ESPE, Neuss, Alemanha, lote: #N641681 e validade: 08/2016) (Fig. 15), tendo sido absorvida por 10s (Duraismy et al., 2015). Os espécimes foram colocados numa solução de saliva artificial e armazenados a 37°C (Duraismy et al., 2015), entre os ciclos de escovagem. Passadas 24 horas, o verniz foi removido usando uma compressa embebida em água destilada.

Destes, 10 espécimes foram submetidos a teste de microdureza de Vickers e 2 a MEV.



Figura 15 - Verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio (*ClinproTM White Varnish*, 3M ESPE).

Grupo C (n=12) – Grupo de estudo

12 espécimenes foram escovados com uma escova elétrica (*Oral-B, Vitality, Braun*) (Tschope & Meyer-Lueckel, 2012) duas vezes por dia (8h00 e 20h00 - intervalo de 12h) durante 7 dias. A escovagem foi feita com pasta dentífrica fluoretada com 1450ppm NaF (*ColgateTM, Triple Action*) (Wang et al., 2011).

Imediatamente e apenas após a primeira escovagem diária, aplicou-se, com um *microbrush*, uma camada de CPP-ACP (*GC Tooth Mousse, RecaldentTM*, GC Europe, lote:150241V, validade: 03/2017) (Fig. 16), durante 3 minutos (Duraismy et al., 2015). Posteriormente os espécimenes foram colocados em nova saliva artificial durante 90 segundos e limpos com uma compressa. Os espécimenes foram colocados numa solução de saliva artificial e armazenados a 37°C (Duraismy et al., 2015) entre os ciclos de escovagem.

Destes, 10 espécimenes foram submetidos a teste de microdureza de Vickers e 2 a MEV.

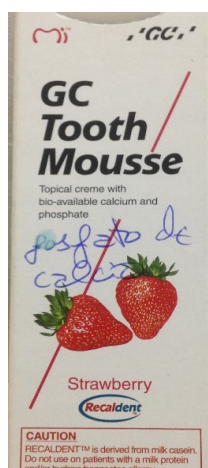


Figura 16 - Pasta de CPP-ACP (*GC Tooth Mousse, RecaldentTM*).

Grupo D (n=12) – Grupo controlo / de Esmalte São

12 espécimenes de esmalte hígido não foram submetidos a indução artificial de lesão de cárie nem a qualquer tratamento remineralizador. Destes, 10 espécimenes foram submetidos a teste de microdureza de Vickers e 2 a MEV.

II.9 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE

II.9.1 Teste de Microdureza de Vickers

10 Espécimenes de cada grupo foram submetidos ao teste de microdureza de Vickers (*Vickers Hardness Tester* – HSV-30T, Shimadzu Corporation, Japão) (Fig. 17) a uma temperatura de 21°C e uma humidade relativa de 50-60%. Foram realizadas 5 indentações em cada espécime (Fig. 18) com uma carga de 29,42 N durante 5 segundos (Fig 19), de forma aleatória, em diferentes regiões e com alguma distância entre si para evitar *stress* residual, perfazendo um total de 200 indentações: 50 indentações por grupo. Os valores foram obtidos em HV, a unidade de dureza de Vickers.



Figura 17 - Máquina HSV-30® (Shimadzu) usada nos testes de microdureza de Vickers.

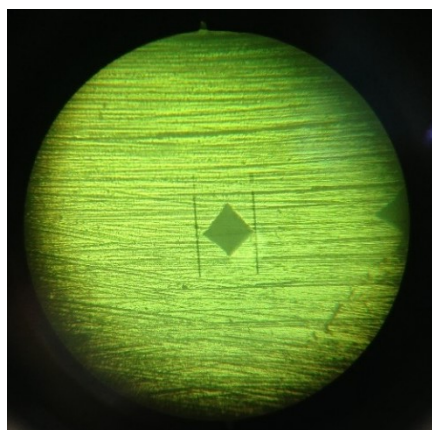


Figura 18 - Exemplo de indentação num espécime.



Figura 19 - Exemplo de medição de dureza de um espécime.

Foi calculada a média e o desvio padrão de cada grupo e os dados foram submetidos a tratamento estatístico através do programa SPSS.

Para determinar a existência de diferenças entre os diferentes grupos, foi realizando o teste paramétrico ANOVA a um fator (*one-way*).

Os pressupostos deste método estatístico, nomeadamente as normalidades das distribuições e a homogeneidade de variâncias, foram avaliados com o teste de Shapiro-Wilk e de Levene, respetivamente. Após realização do teste de normalidade, foi necessária a eliminação de dois *outliers* do grupo C correspondentes a duas indentações de diferentes espécimes, e um *outlier* do grupo D, correspondente a um espécime. Depois da sua eliminação e de verificadas a independência, distribuição normal e a homogeneidade, realizou-se o teste ANOVA. Consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças cujo *p-value* do teste fosse inferior ou igual a 0,05. Uma vez rejeitada a hipóse nula no teste ANOVA, efetuou-se a comparação múltipla das médias dos grupos, recorrendo-se aos testes *post-hoc* e optando-se pelo teste de Bonferroni uma vez que se trata de uma amostra pequena.

II.9.2 Observação ao Microscópio Eletrónico de Varrimento

2 espécimes de cada grupo foram analisados com o microscópio eletrónico de varrimento (JEOL JSM-700001F) (Fig. 20). Previamente todos os espécimes foram montados em peças de alumínio e foram recobertos com uma liga de Ouro/Paládio a 20mA e 1,4kV durante 3 minutos, num revestidor de bombardeamento iónico – *Quorum Technologies* modelo Q150T ES (Sussex, Reino Unido) (Fig. 21).



Figura 20 - Microscópio Eletrónico de Varrimento (JEOL JSM-700001F) utilizado neste trabalho para a análise da superfície dos espécimenes.



Figura 21 - Metalização dos espécimenes no Quorum Technologies modelo Q150T ES.

III. RESULTADOS

III.1 TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS

A tabela 3 representa as medidas descritivas dos diferentes estudos como o número de espécimenes utilizados (N), a média, o desvio padrão e o limite superior e inferior.

O grupo A, correspondente ao grupo submetido ao tratamento apenas com pasta dentífrica fluoretada, apresentou os menores valores de dureza de superfície, com uma dureza de $357,46 \pm 21,61$ HV.

O grupo B, correspondente ao grupo submetido ao tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, apresentou valor de dureza de $380,56 \pm 23,73$ HV.

O grupo C, correspondente ao grupo submetido ao tratamento com pasta dentífrica fluoretada e CPP-ACP, foi o que apresentou maiores valores de dureza de superfície, com uma dureza de $430,78 \pm 21,03$ HV.

Os valores de dureza do grupo D, correspondente aos espécimenes de esmalte são, apresentaram uma dureza média de $360,11 \pm 17,93$ HV.

Tabela 3 - Medidas descritivas dos diferentes grupos.

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	95% Intervalo de Confiança de Média	
				Limite Inferior	Limite Superior
A	10	357,46	21,61	341,99	372,92
B	10	380,56	23,73	363,59	397,53
C	10	430,78	21,03	415,73	445,82
D	9	360,11	17,93	346,33	373,89

Para ilustrar as diferenças entre os grupos, realizou-se um gráfico comparativo aqui apresentado (Fig. 22).

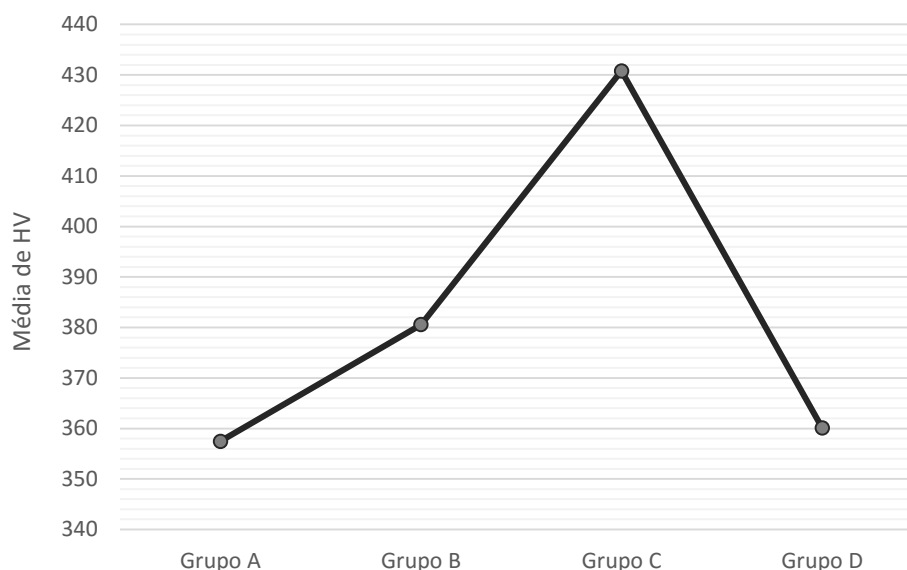


Figura 22 - Gráfico comparativo das médias de microdureza do esmalte dos diferentes grupos.

A maior dureza de superfície foi encontrada no grupo C (pasta dentífrica fluoretada com CPP-ACP), seguida pelo grupo B (pasta dentífrica fluoretada com verniz de flúor com fosfato de cálcio), pelo grupo D (esmalte são) e pelo grupo C (pasta dentífrica fluoretada), respectivamente.

Para determinar a existência de diferenças entre os distintos grupos, foi realizado o teste paramétrico ANOVA a um fator (*one-way ANOVA*). Para tal, os pressupostos destes testes foram verificados, nomeadamente a normalidade de cada amostra e a homogeneidade das variâncias.

A normalidade da distribuição foi determinada, após remoção dos *outliers*, pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo que uma significância superior a 0,05 corresponde a uma distribuição normal. Assim, como se pode observar na tabela 4, todos os grupos apresentam uma distribuição normal ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Resultados do teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Grupos	Estatística	N	Significância
A	0,959	10	0,775
B	0,917	10	0,329
C	0,937	10	0,517
D	0,868	9	0,118

A homogeneidade das variâncias dos diferentes grupos foi avaliada pelo teste de Levene. Como se pode observar na tabela 5, o pressuposto do teste ANOVA relativo à homogeneidade dos grupos foi validado dado que apresentou um nível de significância superior a 0,05, ou seja, as variâncias não diferem significativamente entre os grupos.

Tabela 5 - Teste de homogeneidade de variâncias de Levene (df1 = número de grupos -1; df2 = número de espécimes - número de grupos).

Estatística de Levene	df1	df2	Significância
0,489	3	35	0,692

Procedeu-se, então, ao teste ANOVA para avaliar se os grupos apresentavam diferenças entre si, estipulando-se como hipótese nula (H0) a igualdade das médias dos vários grupos, e como hipótese alternativa (H1) a existência de diferenças entre as médias dos grupos. Segundo este teste, para se poder rejeitar a H0 é necessário que o *p-value* (significância) seja inferior a 0,05. De acordo com a tabela 6, a estatística F apresenta um valor de 25,157, e uma significância de 0,001 ($F(3,35)=25,157$, $p<0,001$). Desta forma constata-se que a microdureza de superfície varia consoante o tratamento, rejeitando-se a hipótese nula.

Tabela 6 - Teste paramétrico ANOVA a um fator (*one-way ANOVA*).

	Soma dos quadrados	df	Média	F	Significância
Entre grupos	34120,41	3	11373,47	25,157	0,001
Dentro do grupo	15823,28	35	452,09		

Para verificar quais os pares de grupos cujos valores de microdureza de superfície diferem entre si, utilizou-se o teste *post-hoc* de Bonferroni uma vez que é indicado para pequenas amostras. Segundo este teste, a diferença entre os vários grupos é estatisticamente significativa quando o *p-value* é inferior a 0,05.

Na tabela 7, são demonstrados os valores de diferença das médias e respetivo valor de significância (*p-value*). O grupo A não apresenta diferença significativa entre o grupo B ($p=0,122$) e entre o grupo D ($p=1,000$) mas apresenta diferença significativa em relação

ao grupo C ($p=0,001$). O grupo B não apresenta diferença em relação ao grupo D ($p=0,262$) mas apresenta diferença significativa em relação ao grupo C ($p=0,001$). O grupo C apresenta diferença significativa em relação ao grupo D ($p=0,001$).

Tabela 7 - Resultados da comparação múltipla das médias dos grupos estudados pelo teste de Bonferroni (teste *post-hoc*).

Grupos		Significância (<i>p-value</i>)
A	B	0,122
	C	0,001
	D	1,000
B	C	0,001
	D	0,262
C	D	0,001

Resumindo, os resultados indicam que os grupos A (pasta dentífrica fluoretada), B (pasta dentífrica fluoretada com verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio) e D (esmalte são) não diferem significativamente ($p>0,05$), mas que estes três grupos diferem de C (pasta dentífrica fluoretada com CPP-ACP) ($p<0,05$). Assim, para um intervalo de confiança de 95%, os resultados obtidos sugerem que, assumindo uma indução artificial da cárie eficaz, os grupos A e B induziram uma remineralização do esmalte no sentido da reposição dos valores da microdureza do esmalte são (grupo D). O grupo C induziu também um aumento da microdureza mas para valores estatisticamente superiores aos do esmalte são.

III.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO

Dois espécimes de cada grupo foram sujeitos a Microscopia Eletrónica de Varrimento. Foram avaliados todos os grupos, como já descrito nos Materiais e Métodos,

e foram efetuadas ampliações a x3.000, x10.000 e x30.000. As imagens selecionadas desta análise apresentam-se nas Fig. (de 23 a 34).

Grupo A

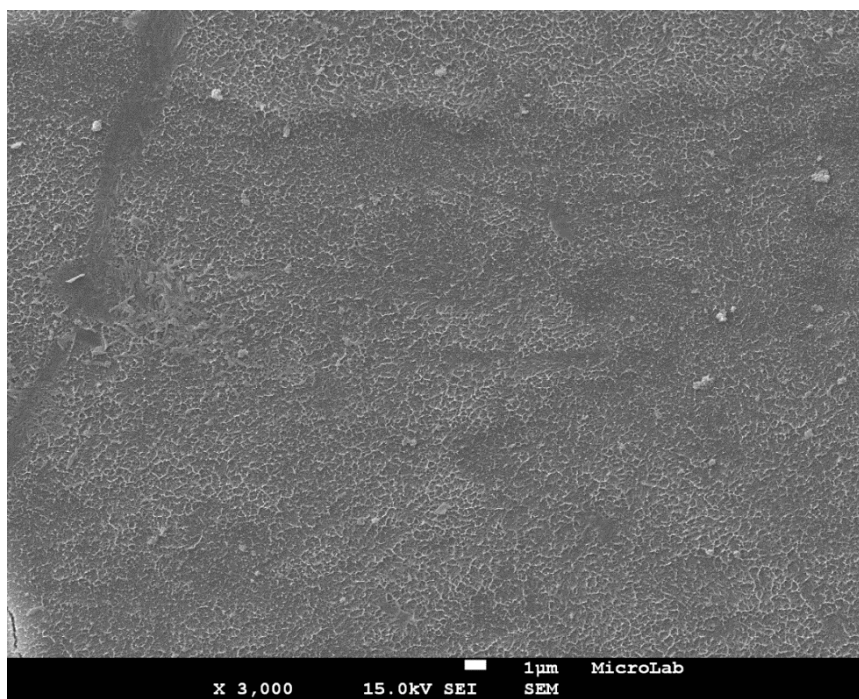


Figura 23 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada.

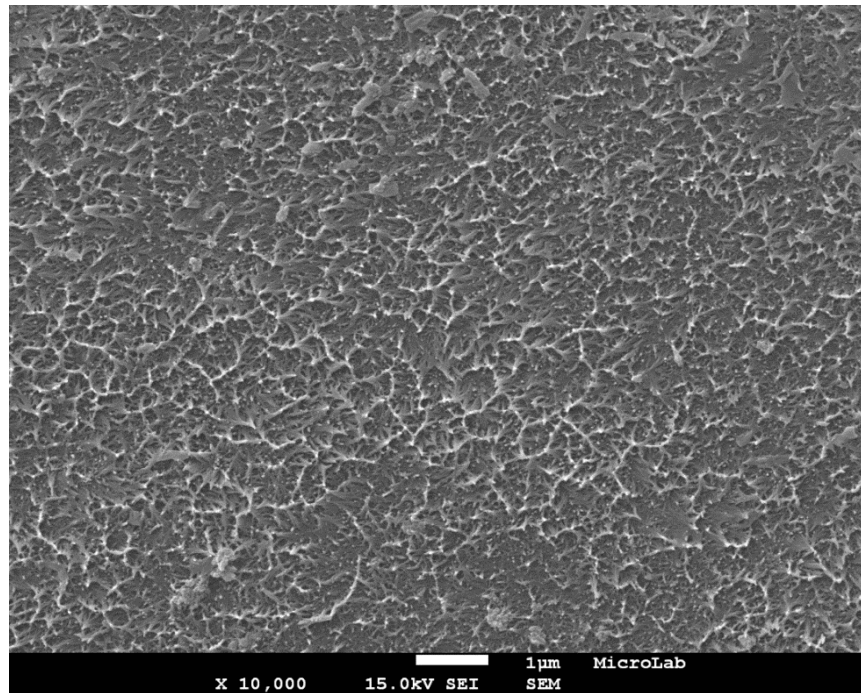


Figura 24 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. A generalidade da superfície apresenta um aspeto lacunar e heterogêneo, com dispersão na orientação dos cristais.

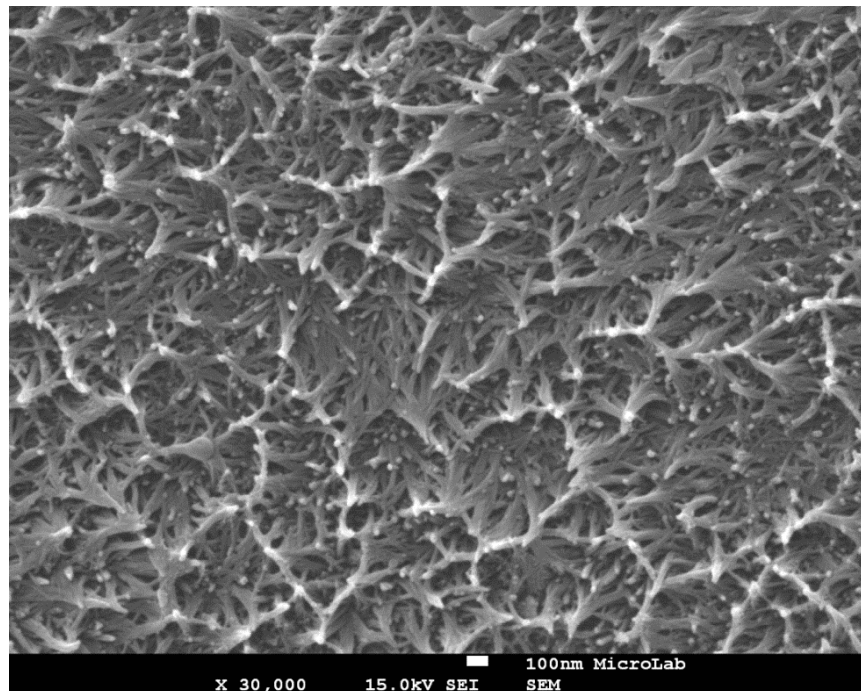


Figura 25 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada. É evidente um aumento da desorganização da superfície, sendo notória a presença de várias lacunas entre os cristais. De notar a diferente orientação dos cristais de esmalte.

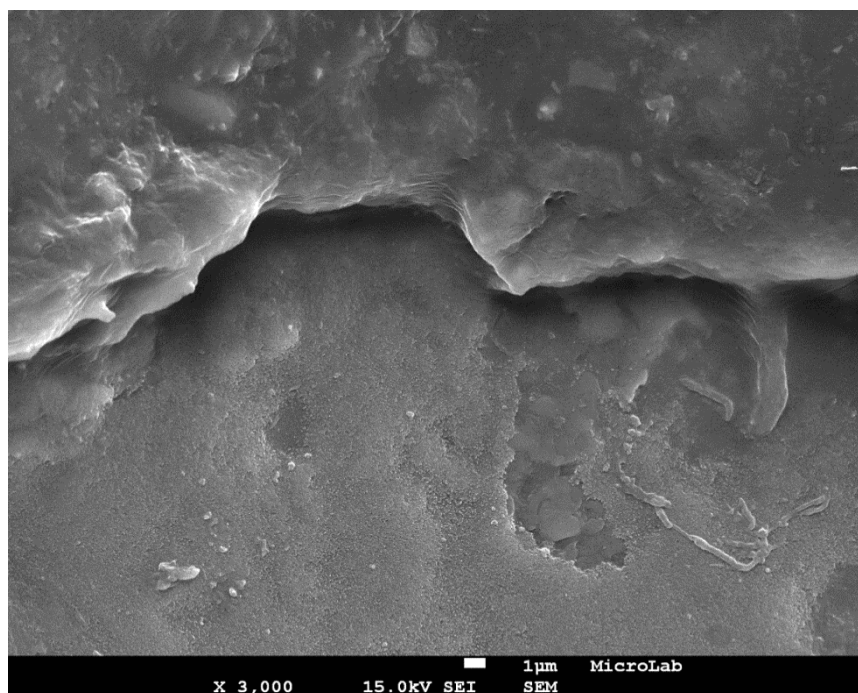
Grupo B

Figura 26 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. Presença de diferentes camadas de verniz de flúor, polimerizado/endurecido sobre a superfície do esmalte.

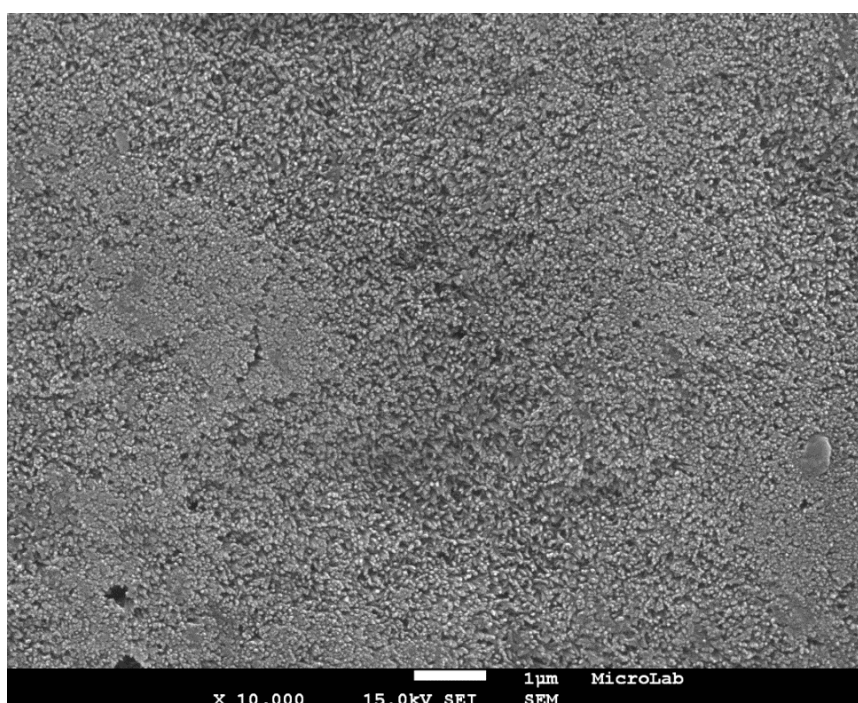


Figura 27 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. É evidente a remineralização generalizada da superfície.

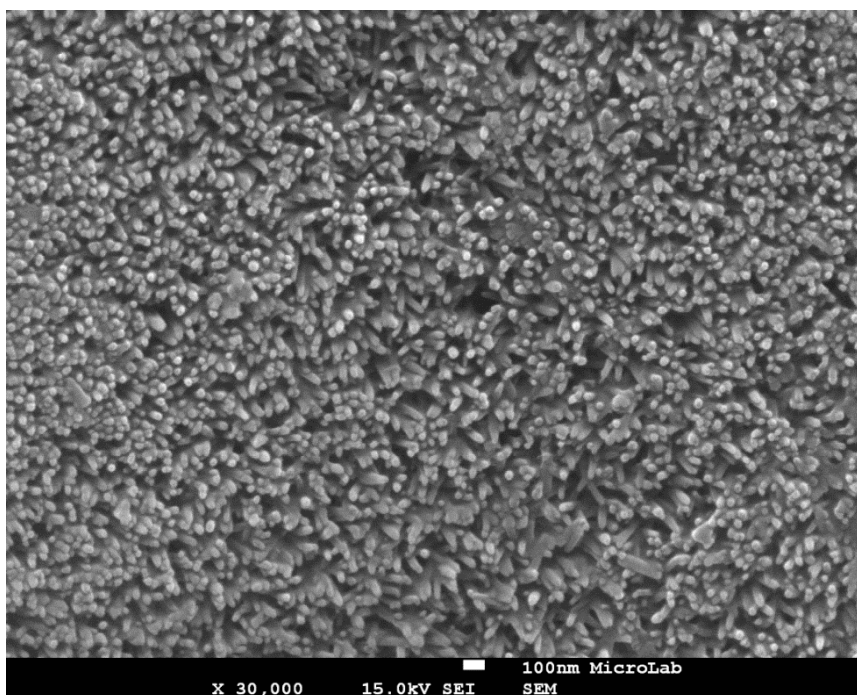


Figura 28 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor com fosfato de cálcio. Evidente oclusão interprismática.

Grupo C

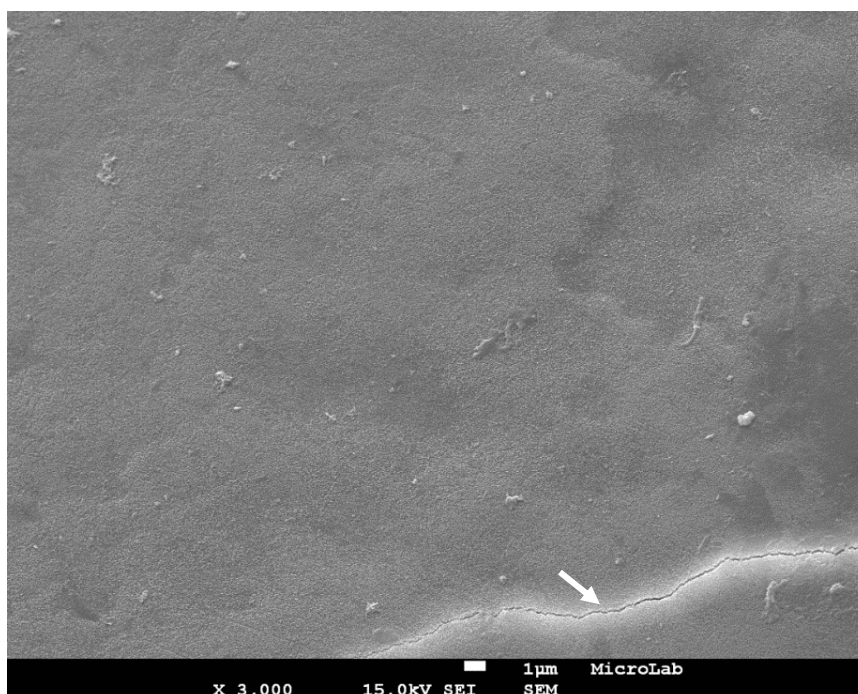


Figura 29 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x3000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observa-se uma fratura de tensão por desidratação (seta).

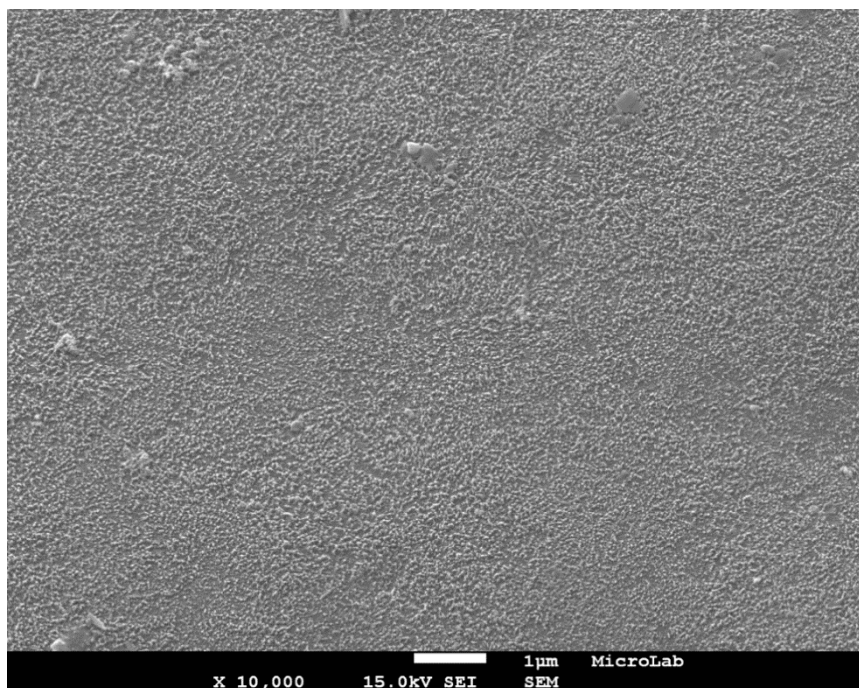


Figura 30 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. É evidente uma superfície mais homogênea sugestiva de deposição mineral pela precipitação de fosfato de cálcio com notório preenchimento das falhas e espaços lacunares originados pelo ácido láctico.

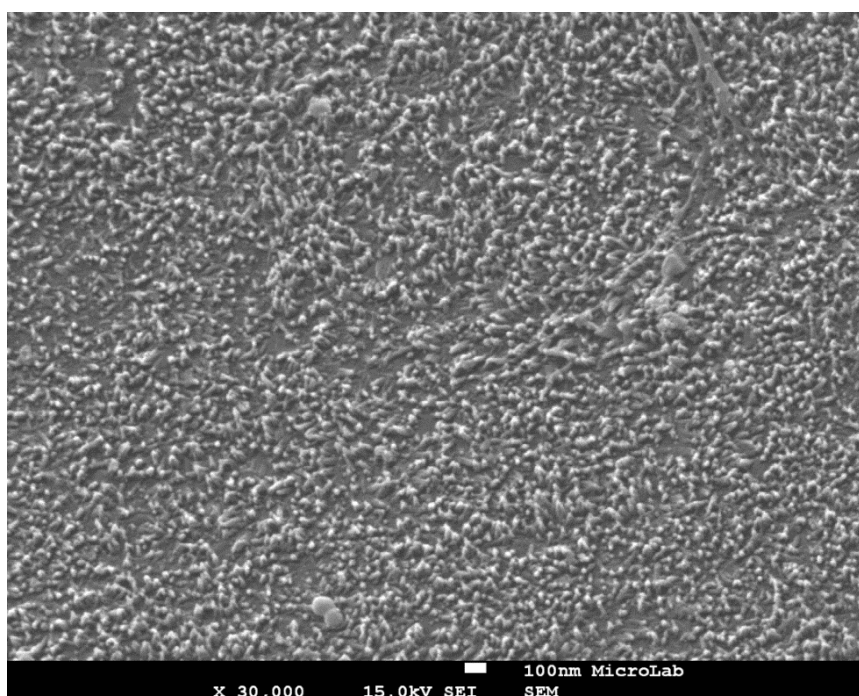


Figura 31 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x30000, após indução de lesão artificial de *white spot* e tratamento com pasta dentífrica fluoretada e pasta de CPP-ACP. Observam-se distintas zonas aglomeradas entre si compatíveis com a deposição mineral do CPP-ACP e preservação de substância interprismática.

Grupo D

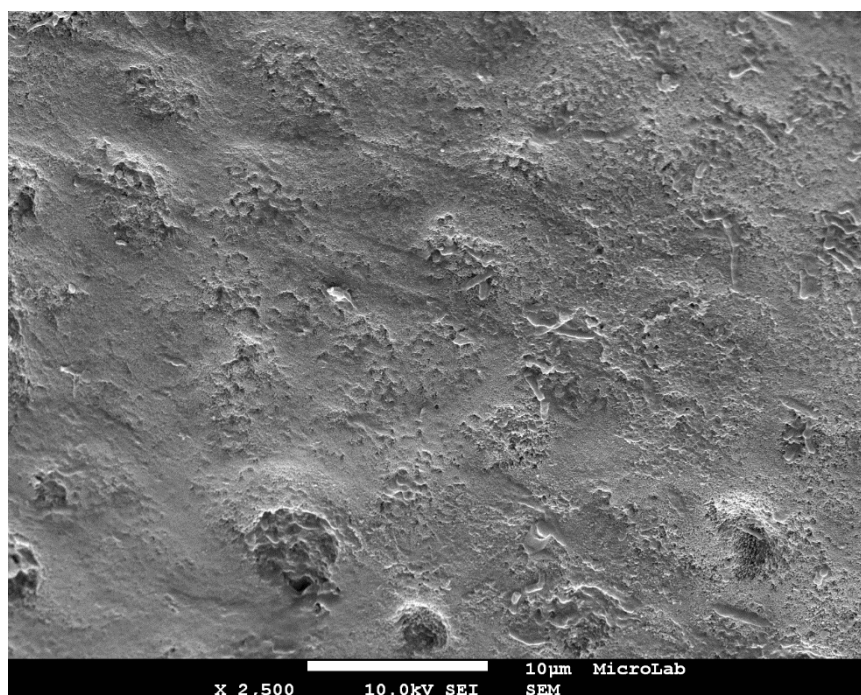


Figura 32 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x2500, sem indução de lesões artificiais de *white spot* ou qualquer tratamento.

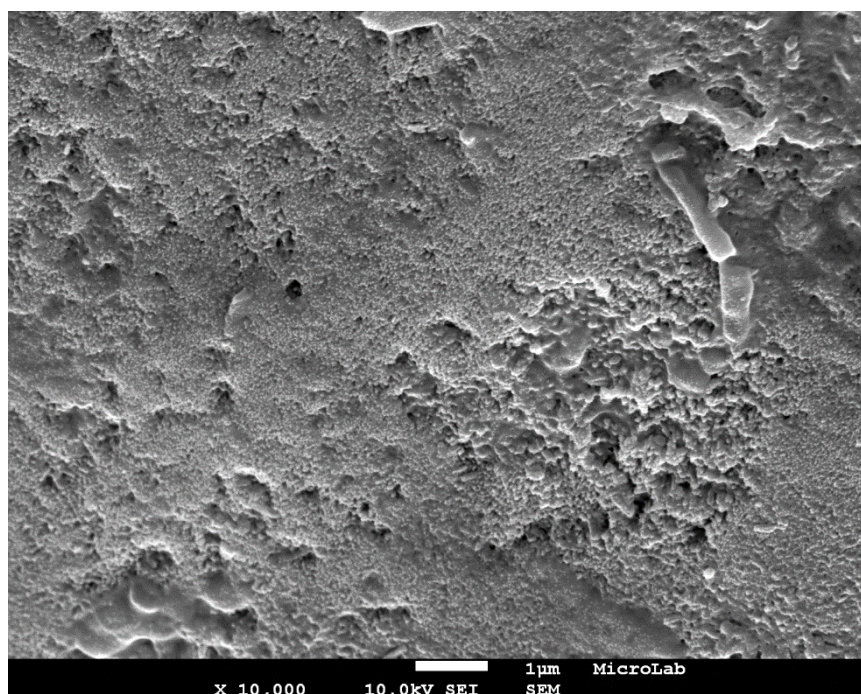


Figura 33 - Fotomicrografia sobre a superfície do esmalte a x10000, sem indução de lesões artificiais de *white spot* ou qualquer tratamento. É evidente a microrugosidade natural do esmalte.

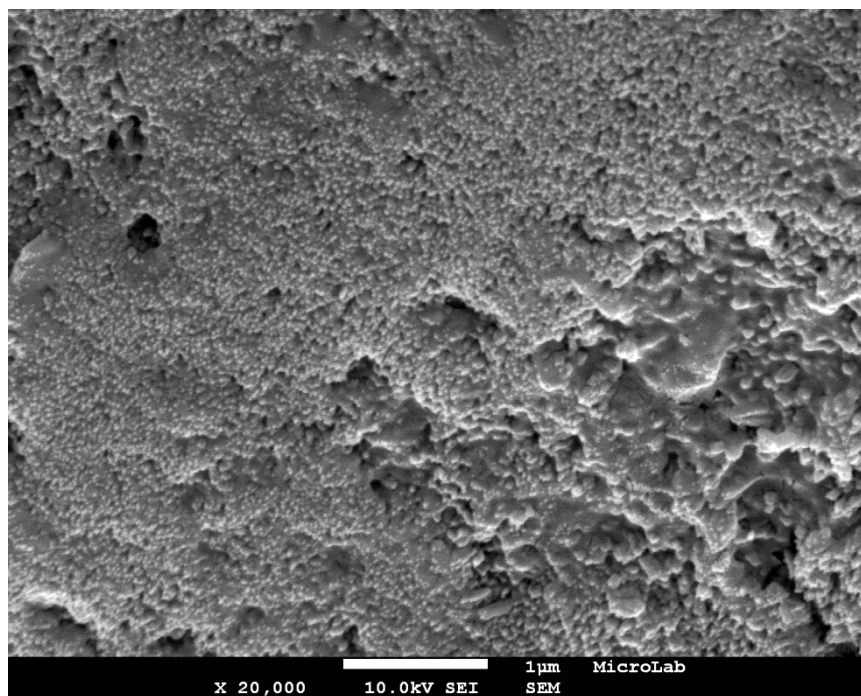
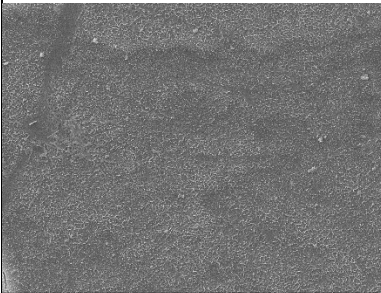
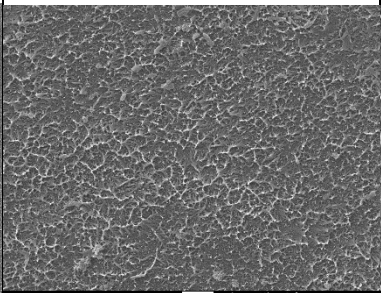
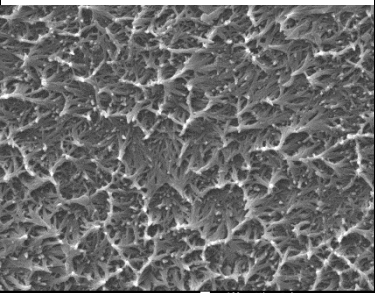
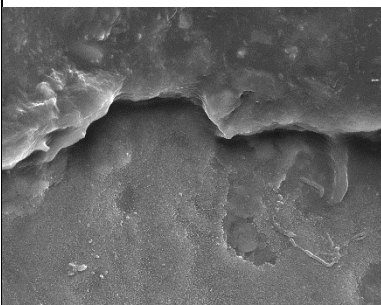
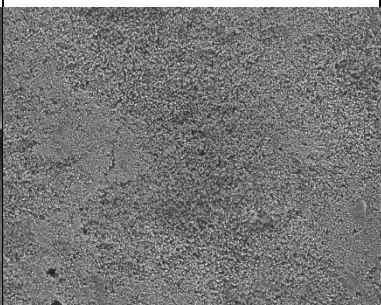
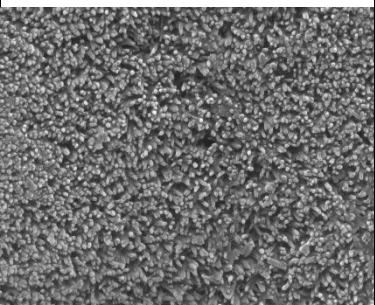
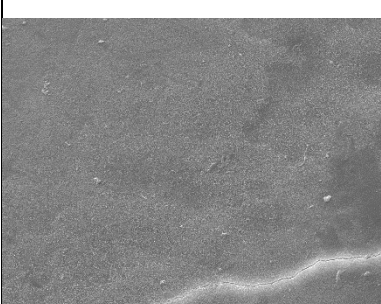
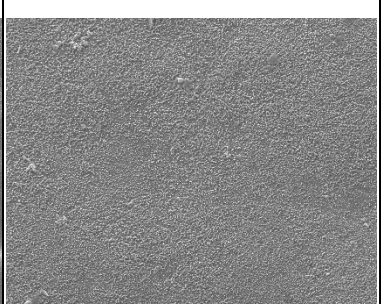
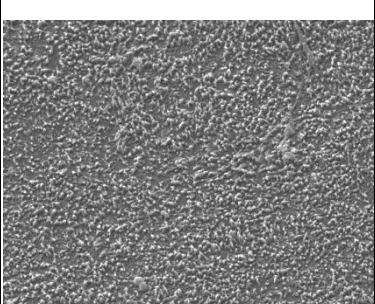
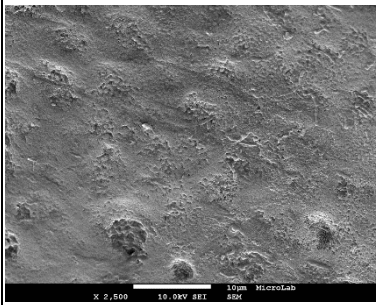
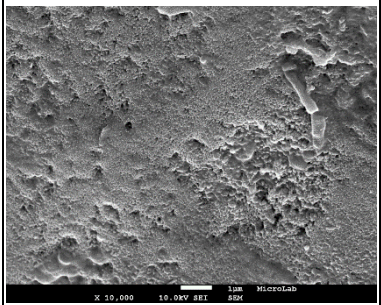
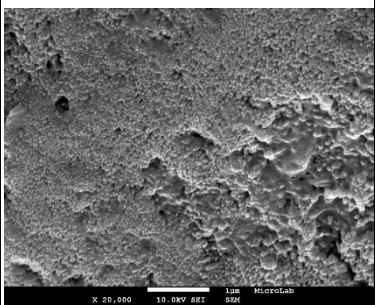


Figura 34 - Fotomicrografia sobre a superfície de esmalte a x20000, sem indução de lesões artificiais de *white spot* ou qualquer tratamento.

Tabela 8 – Resumo das imagens obtidas na microscopia eletrônica de varrimento dos diferentes grupos.

Grupo A (x3000; x10000; x30000)		
		
X 3,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 10,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 30,000 15.0kV SEI 100nm MicroLab SEM
Grupo B (x3000; x10000; x30000)		
		
X 3,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 10,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 30,000 15.0kV SEI 100nm MicroLab SEM
Grupo C (x3000; x10000; x30000)		
		
X 3,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 10,000 15.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 30,000 15.0kV SEI 100nm MicroLab SEM
Grupo D (x2500; x10000; 20000)		
		
X 2,500 10.0kV SEI 10µm MicroLab SEM	X 10,000 10.0kV SEI 1µm MicroLab SEM	X 20,000 10.0kV SEI 1µm MicroLab SEM

IV. DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados diferentes produtos remineralizadores como a pasta dentífrica fluoretada, o verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio e o CPP-ACP, com o intuito de avaliar a sua capacidade de remineralização quando aplicados em superfícies de esmalte desmineralizado. Para comparar a eficácia dos agentes remineralizadores utilizados, os espécimes estudados foram analisados quanto à sua dureza de superfície, utilizando o teste de microdureza de Vickers, e foram observados microscopicamente com recurso ao Microscópio Eletrónico de Varrimento.

IV.1 TESTE DE MICRODUREZA DE VICKERS

O teste da dureza de superfície é considerado simples, não destrutivo e eficaz na avaliação de alterações da microestrutura da superfície dentária, seja em esmalte ou dentina, após processo de desmineralização e remineralização (Neto et al., 2009; Elkassas & Arafa, 2013; Strnad & Buka, 2014; Memarpour et al., 2015). Por esta razão, tem sido diversamente utilizado tanto em estudos *in vitro* como em estudos *in situ* (Damle et al., 2010; Zhang et al., 2011; Elkassas & Arafa, 2013; Strnad & Buka, 2014; Memarpour et al., 2015).

Os valores de dureza do grupo D, correspondente ao grupo de esmalte são, apresentaram uma dureza média de $360,11 \pm 17,93$ HV, concordante com outros estudos publicados que calcularam a microdureza de Vickers do esmalte são (Neto et al., 2009; Prestes et al., 2013; Cardoso et al., 2014; Field, German, & Waterhouse, 2014;).

Após aplicação do ácido láctico, ocorre um aumento dos poros intercrystalinos, devido à perda de mineral, levando a alterações estruturais do esmalte (Melo et al., 2008). Quando a densidade dos cristais e o conteúdo mineral diminuem, as propriedades mecânicas são alteradas, promovendo uma diminuição da dureza do esmalte que pode ser reposta quando aplicados produtos que contenham flúor, cálcio e fosfato necessários à remineralização (Laurance-Young et al., 2011; Lussi et al., 2011; West & Joiner, 2014).

O grupo A, correspondente ao grupo cujos espécimes foram tratados com pasta dentífrica fluoretada, foi eficaz no aumento da dureza de superfície após a indução de lesões de cárie visto que repôs os valores de dureza do esmalte são. Dado que a substituição do ião hidroxilo pelo ião de flúor proporciona um cristal mais resistente e com uma maior dureza, e esta ocorre ao nível da superfície, a pasta dentífrica contendo

flúor proporciona um aumento da dureza de superfície, na medida em que o cristal de fluorapatite apresenta uma maior dureza do que o cristal de hidroxiapatite (West & Joiner, 2014).

Estes resultados são suportados por vários autores que concordam que, quando aplicados produtos fluoretados, a formação de cristais de fluorapatite no esmalte promove uma maior ganho de mineral e um aumento da microdureza de superfície (Tschope & Meyer-Lueckel, 2012; Carmona-Arango et al., 2013; Mohammed et al., 2014; Strnad & Buka, 2014; Memarpour et al., 2015).

No entanto, sabe-se que para uma completa remineralização, tanto a nível da subsuperfície como a nível da superfície, é necessária a coexistência dos iões de flúor, fosfato e cálcio e não de apenas flúor (Cochrane et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013; Li et al., 2014).

O grupo B, correspondente ao grupo em que foi adicionada a aplicação de verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio à pasta dentífrica fluoretada, não apresentou diferenças significativas na média de dureza de superfície em relação ao esmalte são, indicando que o grupo foi eficaz no aumento da dureza de superfície. No entanto, a adição do verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio não mostrou diferenças significativas estatisticamente quando comparado à aplicação de apenas pasta dentífrica fluoretada. O *ClinproTM White Varnish*, por não ser um sistema estável e por se tratar da aplicação de uma camada superficial de verniz, leva a uma rápida precipitação do cálcio e fosfato ao nível da superfície da lesão, impedindo a continuação da remineralização no corpo da lesão (Oliveira et. al, 2014). Também pelo facto do *ClinproTM White Varnish* apresentar uma elevada concentração de flúor (22.600ppm), ocorre uma rápida remineralização da superfície de esmalte que restringe, também, a passagem de iões em profundidade às camadas mais afetadas (Jo et al., 2014).

Um estudo, realizado em 2015, que comparou o conteúdo mineral, através de microradiografia transversal, libertado por diferentes vernizes contendo flúor e outros com flúor e fosfato de cálcio como o *ClinproTM White Varnish*, não obteve diferenças estatisticamente significativas na inibição da desmineralização entre vernizes contendo apenas flúor e o *ClinproTM White Varnish* (Shen et al., 2015).

Estes resultados podem-se dever ao facto do fTCP, existente no *ClinproTM White Varnish*, apresentar uma baixa solubilidade e partículas com um largo diâmetro que impedem a difusão das suas partículas para a subsuperfície (Shen et al., 2010; Shen et al., 2015). Por estas razões, a adição do verniz de flúor de alta concentração com fosfato de

cálcio não difere significativamente quanto à dureza de superfície da aplicação de apenas pasta dentífrica fluoretada.

No entanto, outras investigações concordam que o *Clinpro™ White Varnish* tem a capacidade de remineralizar o esmalte e aumentar a dureza de superfície do mesmo (Elkassas & Arafa, 2013; Jo et al., 2014). Estes resultados discrepantes podem-se dever a alterações do tipo de estudo como um maior número da amostra, uma diferente forma de induzir lesões de cárie e um período de tempo mais extenso de remineralização.

Por fim, o grupo C, correspondente ao grupo em que foi adicionada a aplicação de CPP-ACP à pasta dentífrica fluoretada, foi o que obteve melhores resultados quanto à dureza de superfície, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em relação aos outros grupos. Uma vez que apresentou uma média de dureza de superfície superior à do esmalte hígido, depreende-se que a combinação da pasta dentífrica fluoretada com o CPP-ACP atuou no sentido da remineralização.

Estes resultados são compatíveis com outros estudos publicados que demonstram que o CPP-ACP é, de facto, um potente agente remineralizador e aumenta a microdureza de esmalte desmineralizado (Reynolds et al., 2008; Zhang et al., 2011; Prestes et al., 2013; Memarpour et al., 2015; Shen et al., 2015). Enquanto outros produtos contendo fosfato e cálcio podem levar a uma rápida precipitação destes iões a nível superficial, o CPP-ACP impede este acontecimento devido à presença do CPP que estabiliza aglomerados de fosfato e cálcio em alta concentração sobre a forma de nanocomplexos amorfos. Ao se localizar na superfície do dente de forma estável, o CPP-ACP permite a difusão destes iões em profundidade, permitindo a remineralização desde o corpo da lesão até à sua superfície melhorando as suas propriedades mecânicas ao tornar o esmalte mais resistente e com uma maior dureza (Oliveira et. al, 2014).

O efeito sinérgico da combinação do CPP-ACP com o flúor também foi demonstrado em vários outros estudos (Reynolds, 2008; Neto et al., 2009; Duraisamy et al., 2015; Llena et al., 2015; Shen et al., 2015).

Este efeito anticariogénico aditivo deve-se ao facto de que, quando combinados, estes dois produtos formam uma nova fase – ACFP, que cuja localização na superfície do esmalte pela estabilização do CPP, leva à coexistência dos iões de cálcio, flúor e fosfato que se encontram biodisponíveis num rácio necessário à difusão para a subsuperfície da lesão e formação de fluorapatite (Reynolds, 2008). Estes nanocomplexos de CPP-ACFP formados apresentam um raio hidrodinâmico de $2,12 \pm 0,26\text{nm}$ e são complexos com

carga elétrica neutra o que permite a difusão para a subsuperfície e superfície do esmalte através dos espaços interprismáticos (Cochrane et al., 2010; Shen et al., 2015).

Neste estudo, a aplicação de CPP-ACP aumentou mais a remineralização do que a aplicação do verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, o *ClinproTM White Varnish*, e de pasta dentífrica fluoretada, o que é consistente com outro estudo realizado por (Shen et al., 2015) que, através de microradiografia transversal, concluiu que o CPP-ACP libertava maior quantidade de iões de cálcio e fosfato inorgânico, necessários à remineralização, do que o *ClinproTM White Varnish* e que outros produtos que só continham flúor.

Estes resultados são contraditórios com estudos realizados *in vivo*, que não mostram um melhor efeito do CPP-ACP quando comparado com outros produtos fluoretados (Li et al., 2014). Isto pode-se dever à ausência de película adquirida e da sua capacidade de influenciar as trocas iónicas neste estudo *in vitro*, que proporciona um ambiente mais favorável à supersaturação de cálcio e fosfato promovido pelo CPP-ACP e, portanto, ao aumento da sua remineralização.

A saliva artificial, adicionada a todos os grupos, ao conter $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaCl_2 para melhor reproduzir o ambiente oral, causou também um aumento da remineralização e, conseqüentemente, da dureza de superfície dos diferentes grupos estudados. Vários estudos demonstraram que a saliva artificial contendo iões de cálcio e fosfato promoveram a remineralização (Tschoppe & Meyer-Lueckel, 2012; Ionta et al., 2014; Oliveira et. al, 2014).

Apesar deste estudo ser incapaz de simular completamente as características naturais da cavidade oral, consegue demonstrar a efectividade dos produtos fluoretados e do CPP-ACP na remineralização de lesões artificiais de cárie.

IV.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE AO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO

A MEV é um instrumento complementar qualitativo, frequentemente utilizado em investigações (Damle et al., 2010; Zhang et al., 2011; Elkassas & Arafa, 2013; Zheng et al., 2013) uma vez que permite observar as alterações micromorfológicas superficiais induzidas por diferentes agentes remineralizadores (Elkassas & Arafa, 2013), fornecendo informação topográfica, imagens de alta resolução e tridimensionais (Chen et al., 2015).

Quando observadas através da MEV, as imagens referentes ao grupo D, representativas de esmalte dentário hígido, apresentam um aspeto nebuloso com aparência homogénea devido à firme união dos cristais de HA, uma vez que não existe exposição dos cristais. Pode-se, então, observar a microrugosidade natural do esmalte.

O estágio inicial da cárie dentária caracteriza-se pela amplificação dos espaços interprismáticos do esmalte, os quais contribuem para o aumento da porosidade da região, criando espaços vazios e lacunas na subsuperfície do esmalte e não apenas na superfície como ocorre na erosão. Para isso, para a eficaz remineralização do esmalte é necessária a penetração dos iões a um nível subsuperficial (Elkassas & Arafa, 2013; Fejerskov et al., 2015).

Nas imagens referentes ao grupo A, em que foi apenas aplicada pasta dentífrica fluoretada, após indução de lesões de cárie, é notória uma rugosidade e desorganização da superfície e uma dispersão na orientação dos cristais. Isto porque o seu conteúdo pode não ter sido suficiente para preencher todas as lacunas existentes.

Nas imagens referente ao grupo B, em que foi adicionado verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio à pasta dentífrica, é notória uma superfície mais regular e uma orientação dos cristais mais semelhante entre si. É possível também avaliar uma diferença entre camadas de aplicação do verniz pela sua propriedade de polimerizar e endurecer sobre o dente como foi observado num estudo que usou outro verniz de flúor, o Duraphat (Gontijo, Cruz, & Brandão, 2007). É de notar um maior preenchimento das lacunas devido aos depósitos de fosfato de cálcio, no entanto, ainda se pode observar alguma desorientação dos cristais e algumas lacunas pelo facto do *ClinproTM White Varnish* apresentar partículas de grande diâmetro que não conseguem penetrar nas lacunas mais profundas.

Por fim, as imagens referentes ao grupo C, em que foi adicionado CPP-ACP à pasta dentífrica fluoretada, apresentam uma superfície mais homogénea e um maior preenchimento das lacunas quando comparado aos dois grupos anteriores.

O CPP-ACP quando combinado com a pasta dentífrica promove uma supersaturação de iões de flúor, cálcio e fosfato, proporcionando todos os iões necessários para a formação de cristais de fluorapatite. Uma vez que se trata de um sistema estável, estes iões difundem-se para as zonas subsuperficiais e são depositados ao nível do espaço interprismático para poderem ser adicionados aos cristais reproduzindo imagens compatíveis a uma homogeneidade da superfície do esmalte. Foi estudado que o CPP-ACP se une a paredes específicas do cristal de hidroxiapatite que permite o crescimento

do cristal ao longo do seu eixo axial, que corresponde ao padrão de crescimento do cristal durante a amelogenese, permitindo então uma orientação mais regular e paralela dos cristais (Cochrane et al., 2010).

De acordo com outros estudos, o CPP-ACP foi efetivo na remineralização dos prismas de esmalte reparando a subsuperfície e superfície do esmalte alteradas pela indução de cárie, pela incorporação do fosfato de cálcio amorfo nas zonas porosas do esmalte desmineralizado produzindo uma camada mais regular (Elkassas & Arafa, 2013; Farooq et al., 2013; Zheng et al., 2013). Outras investigações concordam que a remineralização do esmalte com CPP-ACP proporciona uma imagem mais lisa, regular e homogênea pelo preenchimento das fissuras e lacunas produzidas pela desmineralização (Damle et al., 2010; Elkassas & Arafa, 2013).

Todos os grupos submetidos a tratamento apresentam sinais de remineralização, sendo que o grau de remineralização é mais evidente no grupo C (pasta dentífrica fluoretada e CPP-ACP), seguido pelo grupo B (pasta dentífrica fluoretada e verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio) e pelo grupo A (pasta dentífrica fluoretada).

Relacionando a análise da dureza de superfície com a análise topográfica, uma vez que a orientação e a densidade dos cristais interfere nas propriedades mecânicas, quando existe uma menor organização e menor densidade dos cristais, a dureza é afetada negativamente (Zhang et al., 2014). Assim, quando os cristais se encontram mais desorganizados e perpendiculares entre si, como se observa no grupo A e no grupo B, a dureza do esmalte é inferior. Já no grupo C, a maior organização e paralelismo entre os cristais, é necessária uma força maior para provocar a ruptura destas estruturas, apresentando melhores propriedades mecânicas.

Foi possível constatar que o aspecto topográfico das imagens obtidas com auxílio da MEV foram consistentes com os valores de microdureza de superfície, para os distintos grupos.

IV.3 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma vez que a cárie se trata de uma condição multifatorial dependendo de diversas variantes para que a mesma progrida, e os estudos *in vitro* não reproduzem as condições fisiológicas na totalidade, o estudo apenas reflete os aspectos físico-químicos da desmineralização do esmalte.

Outra limitação do estudo prende-se com o facto de se ter utilizado saliva artificial em alternativa ao uso de saliva natural, pela sua dificuldade de recolha e rápida decomposição. Assim, as características biológicas da saliva não foram totalmente reproduzidas, apresentando uma capacidade protetora diminuída.

Visto que foram utilizados dentes humanos e estes possuem uma diferente distribuição do seu conteúdo mineral sendo que a densidade dos cristais não são uniformes em toda a sua extensão, as suas propriedades mecânicas, como a dureza, podem diferir consoante a zona onde esta é medida.

De modo a realizar as medições da microdureza de superfície foi necessário o polimento da superfície de esmalte dos espécimes, promovendo também a sua padronização. No entanto, a remoção da camada mais externa do esmalte torna-o mais suscetível à desmineralização podendo levar a variações dos resultados do estudo quando comparado com estudos *in situ*.

A não existência de um grupo de esmalte sujeito apenas ao ácido láctico, que permitisse a comparação quantitativa e qualitativa entre este e o esmalte tratado, foi uma limitação.

Outra limitação foi também o curto período de tempo do estudo (uma semana), uma vez que as alterações produzidas pelos agentes remineralizantes são mais evidentes com o aumento da duração do seu uso.

IV.4 PERSPETIVAS FUTURAS

Futuramente, seria interessante comparar o uso destes produtos ao longo de um período de tempo mais extenso e com um maior número de amostras. Poderiam ser também realizados ciclos de pH, que demonstrassem a capacidade remineralizadora destes produtos após um segundo ataque ácido e poderia ser avaliada a quantificação de iões de flúor, fosfato e cálcio libertados aquando desse ataque ácido. Seria, também, interessante comparar o tamanho das partículas dos produtos utilizados ao tamanho lacunar do esmalte desmineralizado.

V. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no estudo e, perante as suas limitações, é possível concluir que:

- Após indução artificial de cárie e aplicação de uma pasta dentífrica fluoretada, a microdureza de superfície não apresentou diferenças significativas à do esmalte são, o que sugere que a pasta dentífrica fluoretada contribuiu para um aumento da dureza de superfície, sugestiva de remineralização;
- Após indução artificial de cárie e aplicação de verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, a microdureza de superfície não apresentou diferenças significativas quanto ao esmalte são nem quanto à aplicação de apenas pasta dentífrica fluoretada, o que sugere que a aplicação do verniz não faz diferença no aumento da dureza de superfície quando comparado à aplicação única de pasta dentífrica fluoretada;
- Após indução artificial de cárie e aplicação de CPP-ACP, a microdureza de superfície apresentou uma microdureza de superfície superior quando comparada aos outros tratamentos, sugerindo uma maior capacidade de aumentar a dureza de superfície, sugestiva de uma maior remineralização;
- Após indução artificial de cárie e aplicação de pasta dentífrica fluoretada, observou-se uma menor qualidade de superfície do esmalte quando comparado aos outros tratamentos;
- A combinação de pasta dentífrica fluoretada com verniz de flúor de alta concentração com fosfato de cálcio, após indução artificial de cárie, apresentou alterações qualitativas no esmalte;
- Microscopicamente, a combinação de pasta dentífrica fluoretada com CPP-ACP, após indução artificial de cárie, foi a que apresentou uma melhor qualidade de superfície do esmalte.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aykut-Yetkiner, A., Wiegand, A., & Attin, T. (2014). The effect of saliva substitutes on enamel erosion in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(6), 720–725. doi:10.1016/j.jdent.2014.03.012
- Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R. & Moxham, B. J. (2009). *Oral Anatomy, Histology and Embryology* (4ª Edição). Mosby Elsevier. ISBN: 9780723435518
- Bishara, S. E., & Ostby, A. W. (2008). White Spot Lesions: Formation , Prevention , and Treatment, 14(3), 174–182. doi:10.1053/j.sodo.2008.03.002
- Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M., & Cate, J. M. (2011). Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control, 22, 97–114. doi:10.1159/000325151
- Campos, P. H., Sanabe, M. E., Rodrigues, J. A., Duarte D. A., Santos M. T., Guaré R. O., ... Diniz M. B. (2015). Different Bacterial Models for In Vitro Induction of Non-Cavitated Enamel Caries-Like Lesions: Microhardness and Polarized Light Microscopy Analyses, 78, 444–451. doi:10.1002/jemt.22493
- Cardoso, C. A. B., Castilho, A. R. F., Salomão, P. M. A., Costa, E. N., Magalhães, A. C., & Buzalaf, M. A. R. (2014). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(11), 1495–1501. doi:10.1016/j.jdent.2014.08.009
- Carmona-Arango, L. E., Lujan-Pardo, M. D. P., & Martinez, F. G. (2013). Toothpaste efficacy with different Fluoride concentrations on white spot lesions, a randomized clinical trial. *CES Odontologia*, 26(2), 22–35.
- Chen, C. L., Parolia, A., Pau, A., & Celerino De Moraes Porto, I. C. (2015). Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Australian Dental Journal*, 60(1), 65–72. doi:10.1111/adj.12275
- Chen, F., & Wang, D. (2011). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(5), 681–694. doi:10.1517/13543771003720491
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1187–1197. doi:10.1177/0022034510376046
- Corrêa-Faria, P., Paixão-Gonçalves, S., Paiva, S. M., & Pordeus, I. A. (2015). Incidence of dental caries in primary dentition and risk factors: a longitudinal study. *Brazilian*

- Oral Research*, 30(1), 1–8. doi:10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0059
- Damle, S. G., Bengude, V., & Saini, S. (2010). Evaluation of Ability of Dentifrices to Remineralize Artificial Caries-Like Lesions. *Journal of Dental Research*, 7(1), 12–17.
- Dawes, C. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 18S–24S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0351
- Du, M., Cheng, N., Tai, B., Jiang, H., Li, J., & Bian, Z. (2012). Randomized controlled trial on fluoride varnish application for treatment of white spot lesion after fixed orthodontic treatment. *Clinical Oral Investigation*, 16(2), 463–468. doi:10.1007/s00784-011-0520-4
- Duraisamy, V., Xavier, A., Nayak, U. A., Reddy, V., & Rao, A. P. (2015). An in vitro evaluation of the demineralization inhibitory effect of F⁻ varnish and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel in young permanent teeth. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7, S513-S517. doi:10.4103/0975-7406.163521
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2013). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466–474. doi:10.1016/j.jdent.2013.12.017
- Farooq, I., Moheet, I. A., Imran Z., & Farooq U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: Casein phosphopeptide – amorphous calcium phosphate (CPP – ACP) complex. *King Saud University Journal of Dental Sciences*, 4(2), 47–51. doi:10.1016/j.ksujds.2013.03.004
- Featherstone, J. D. B. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, 53, 286–291. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x
- Fejerskov, O., Nyvad, B., & Kidd, E. (2015). Dental Caries: The Disease and its Clinical Management. Wiley-Blackwell. 3^a Edição. ISBN: 978-1-118-93582-8
- Field, J. C., German, M. J., & Waterhouse, P. J. (2014). Qualifying the lapped enamel surface: A profilometric, electron microscopic and microhardness study using human, bovine and ovine enamel. *Archives of Oral Biology*, 59(5), 455–460. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.02.007
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel desmineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 25S–

- 34S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0352
- Gontijo, L., Cruz R. A., & Brandão, P. R. G. (2007). Dental Enamel Around Fixed Orthodontic Appliances after Fluoride Varnish Application. *Brazilian Dental Journal*, 18(1), 49–53. doi: 10.1590/S0103-64402007000100011
- Hannig, M., & Hannig, C. (2014). The Pellicle and Erosion. *Monographs in Oral Science*, 25, 206–214. doi:10.1159/000360376
- Ionta, F. Q., Mendonça, F. L., De Oliveira, G. C., Alencar, C. R. B., Honório, H. M., Magalhães, A. C., & Rios, D. (2014). In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. *Journal of Dentistry*, 42(2), 175–179. doi:10.1016/j.jdent.2013.11.009
- Jo, S. Y., Chong, H. J., Lee, E. H., Chang, N. Y., Chae, J. M., Cho, J. H., ... Kang, K. H. (2014). Effects of various toothpastes on remineralization of white spot lesions. *Korean Journal of Orthodontics*, 44(3), 113–118. doi:10.4041/kjod.2014.44.3.113
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., & Marcenes, W. (2015). Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression. *Journal of Dental Research*, 94(5), 650–658. doi:10.1177/0022034515573272
- Keyes, P. H. (1960). The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Finding and Implication. *Archives of Oral Biology*, 1(1), 304–320.
- Laurance-Young, P., Bozec, L., Gracia, L., Rees, G., Lippert, F., Lynch, R. J., & Knowles, J. C. (2011). A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behaviour in relation to erosive challenge and remineralisation. *Journal of Dentistry*, 39(4), 266–272. doi:10.1016/j.jdent.2011.01.008
- Lenzi, T. L., Montagner, A. F., Soares, F. Z., & de Oliveira Rocha, R. (2015). Are topical fluorides effective for treating incipient carious lesions?: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Dental Association*, 147(2), 84–91. doi:10.1016/j.adaj.2015.06.018
- Li, J., Xie, X., Wang, Y., Yin, W., Antoun, J. S., Farella, M., & Mei, L. (2014). Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 42(7), 769–777. doi:10.1016/j.jdent.2014.03.015
- Li, X., Wang, J., Joiner, A., & Chang, J. (2014). The remineralisation of enamel: a review of the literature. *Journal of Dentistry*, 42(1), S12–S20. doi:10.1016/S0300-

5712(14)50003-6

- Lima, J. (2007). Cárie dentária: um novo conceito. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12(6), 119-130. doi:10.1590/S1415-54192007000600012
- Lippert, F., & Lynch, R. J. M. (2014). Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology*, 59(7), 704–710. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.04.005
- Llena, C., Leyda M., Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP vs fluoride varnish in remineralization of early caries lesions. A prospective study. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 16(3), 181-186.
- Lussi, A., Schlueter, N., Rakhmatullina, E., & Ganss, C. (2011). Dental Erosion – An Overview with Emphasis on Chemical and Histopathological Aspects. *Caries Research*, 45(1), 2–12. doi:10.1159/000325915
- Marcenes, W., Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Flaxman, A., Naghavi, M., Lopez, A., & Murray, C. J. L. (2013). Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *Journal of Dental Research*, 92(7), 592–597. doi: /10.1177/0022034513490168
- Melo, P., Azevedo, Á., & Henriques, M. (2008). Cárie dentária – a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 39(6), 253–259. doi: 0873-9781/08/39-6/253
- Memarpour, M., Soltanimehr, E., & Sattarahmady, N. (2015). Efficacy of Calcium- and Fluoride-Containing Materials for the Remineralization of Primary Teeth with Early Enamel Lesion. *Microscopy Research and Technique*, 78(9), 801–806. doi:10.1002/jemt.22543
- Mohammed, N. R., Lynch, R. J. M., & Anderson, P. (2014). Effects of fluoride concentration on enamel demineralization kinetics in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(5), 613–618. doi:10.1016/j.jdent.2013.12.005
- Neto, F. C. R., Maeda, F. A., Turssi, C. P., & Serra, M. C. (2009). Potential agents to control enamel caries-like lesions. *Journal of Dentistry*, 37(10), 786–790. doi:10.1016/j.jdent.2009.06.008
- Niu, L., Zhang, W., Pashley, D. H., Breschi, L., Mao, J., Chen, J., & Tay, F. R. (2014). Biomimetic remineralization of dentin. *Dental Materials*, 30(1), 77–96. doi:10.1016/j.dental.2013.07.013
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2012). Biofunctional Properties of Caseinophosphopeptides in the Oral Cavity. *Caries Research*, 46(3), 234–267.

- doi:10.1159/000338381
- Oliveira, G. M. S., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1592–1602. doi:10.1016/j.jdent.2014.09.004
- Pino, Z., Ar, V., Prado, V., & Tard, V. (2014). Microdureza de caries incipientes artificiales infiltradas con resinas de baja viscosidad antes y después del termociclado. *Avances en odontoestomatología*, 31(6), 371–378. doi:10.4321/S0213-12852015000600005
- Prestes, L., Souza, B. M., Comar, L. P., Salomão, P. A., Rios, D., & Magalhães, A. C. (2013). In situ effect of chewing gum containing CPP-ACP on the mineral precipitation of eroded bovine enamel - A surface hardness analysis. *Journal of Dentistry*, 41(8), 747–751. doi:10.1016/j.jdent.2013.06.006
- Reynolds, E. C. (2008). Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence?. *Australian Dental Journal*, 53(3), 268–273. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00061.x
- Reynolds, E. C., Cai, F., Cochrane, N. J., Shen, P., Walker, G. D., Morgan, M. V., & Reynolds, C. (2008). Fluoride and Casein Phosphopeptide–Amorphous Calcium Phosphate. *Journal of Dental Research*, 87(4), 344–348. doi:10.1177/154405910808700420
- Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., & Kirkham, J. (2000). The Chemistry of Enamel Caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(4), 481–495. doi:10.1177/10454411000110040601
- Sala, E. C., & García, P. B. (2013). *Odontologia preventiva y comunitaria - Principios, Métodos y Aplicaciones*. Elsevier. 4ª Edição. ISBN: 978-84-458-2203-6
- Schlueter, N., Hara, A., Shellis, R. P., & Ganss, C. (2011). Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine. *Caries Research*, 45(1), 13–23. doi:10.1159/000326819
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries, 369(4), 51–59. doi:10.1016/S0140-6736(07)60031-2
- Shen, P., Bagheri, R., Walker, G. D., Yuan, Y., Stanton, D. P., Reynolds, C., & Reynolds, E. C. (2015). Effect of calcium phosphate addition to fluoride containing dental varnishes on enamel demineralization. *Australian Dental Journal*, 61(3), 357–365. doi:10.1111/adj.12385

- Shen, P., Manton, D. J., Cochrane, N. J., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., & Reynolds, E. C. (2010). Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *Journal of Dentistry*, 39(7), 518–525. doi:10.1016/j.jdent.2011.05.002
- Silva, R. M., Ferreira, J. M. S., Silva, C. D. B., Fontes, L. B. C., Granville-Garcia, A. F., & Menezes, V. A. (2012). In vivo evaluation of therapeutic potential of fluoride varnishes. *Revista Odonto Ciência*, 27(3), 233–237. doi:10.1590/S1980-65232012000300011
- Souza, J. B., Rodrigues, P. C. F., Lopes, L. G., Guilherme, A. S., Freitas, G. C., & Moreira, F. do C. L. (2009). Hipoplasia do esmalte: tratamento restaurador estético. *Revista Odontológica Do Brasil Central*, 18(47), 14–19.
- Stewart, R. E., & Hale, K. J. (2003). The paradigm shift in the etiology, prevention, and management of dental caries: its effect on the practice of clinical dentistry. *Journal of the California Dental Association*, 31(3), 247–251.
- Strnad, G., & Buka, I. (2014). Effect of Acid Erosion Followed by Remineralization Process on Microhardness of Dental Enamel. *Procedia Technology*, 12, 308–315. doi:10.1016/j.protcy.2013.12.491
- Sudjalim, T. R., Woods, M. G., & Manton, D. J. (2006). Prevention of white spot lesions in orthodontic practice: a contemporary review. *Australian Dental Journal*, 51(4), 284–289.
- Torres, C. R. G., Borges, A. B., Torres, L. M. S., Gomes, I. S., & Oliveira, R. S. (2011). Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *Journal of Dentistry*, 39(3), 202–207. doi:10.1016/j.jdent.2010.12.004
- Tschope, P., & Meyer-Lueckel, H. (2012). Effects of regular and highly fluoridated toothpastes in combination with saliva substitutes on artificial enamel caries lesions differing in mineral content. *Archives of Oral Biology*, 57(7), 931–939. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.010
- Urban, V. M., Machado, A. L., Vergani, C. E., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C., de Almeida, F. G., & Cass, Q. B. (2009). Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dental Materials*, 25(5), 662–671. doi:10.1016/j.dental.2008.10.017
- Veiga, N., Pereira, C., & Amaral, O. (2015). Prevalence and determinants of dental caries

- in Portuguese children. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 171, 995–1002. doi:10.1016/j.sbspro.2015.01.219
- Wang, X., Mihailova, B., Klocke, A., Heidrich, S., & Bismayer, U. (2011). Effect of artificial saliva on the apatite structure of eroded enamel. *International Journal of Spectroscopy*, 2011, 9. doi:10.1155/2011/236496
- Wang, Z., Jiang, T., Sauro, S., Pashley, D. H., Toledano, M., Osorio, R., ... Wang, Y. (2011). The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: An in vitro study. *Australian Dental Journal*, 56(4), 372–381. doi:10.1111/j.1834-7819.2011.01361.x
- West, N. X., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42(1), S2–S11. doi:10.1016/S0300-5712(14)50002-4
- Xiang, C., Ran, J., Yang, Q., Li, W., Zhou, X., & Zhang, L. (2012). Effects of enamel matrix derivative on remineralisation of initial enamel carious lesions in vitro. *Archives of Oral Biology*, 58(4), 362–369. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.09.013
- Zhang, Q., Zou, J., Yang, R. A. N., & Zhou, X. (2011). Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 21(5), 374–381. doi:10.1111/j.1365-263X.2011.01135.x
- Zhang, Y. R., Du, W., Zhou, X. D., & Yu, H. Y. (2014). Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *International Journal of Oral Science*, 6(2), 61–69. doi:10.1038/ijos.2014.21
- Zhang, Y. F., Zheng, J., Zheng, L., & Zhou, Z. R. (2015). Effect of adsorption time on the adhesion strength between salivary pellicle and human tooth enamel. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 42, 257–266. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.11.024
- Zheng, L., Zheng, J., Zhang, Y. F., Qian, L. M., Zhou, Z. R. (2013). Effect of CPP-ACP on the remineralization of acid-eroded human tooth enamel: nanomechanical properties and microtribological behaviour study. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46. doi:10.1088/0022-3727/46/40/404006